

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE ELISE WACULICZ-ANDRADE

**Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas
e da vegetação espontânea**

CURITIBA

2009

CAROLINE ELISE WACULICZ-ANDRADE

**Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas
e da vegetação espontânea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Genética.

Orientadora: Prof. Dr^a. Chirlei Glienke
Co-Orientadora: Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro
Co-Orientador: Dr Marcel Spósito

CURITIBA

2009

Ao meu grande amor, amigo e companheiro Clayson.
Aos meus dois príncipes amados, Tiago e João Pedro.
Aos meus pais Pedro e Daisi.
Aos meus irmãos Kristoferson e Guilherme.
Aos meus sogros Cláudio e Noemi.
Por todo o amor, por quem sou e por tudo o que
alcancei.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me possibilitado a realização desta dissertação.

À Professora Dr^a. Chirlei Glienke pela oportunidade, ensinamentos e inestimáveis sugestões e contribuições oferecidas, que além de orientadora foi incentivadora e grande amiga em todos os momentos.

À Professora Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro, minha co-orientadora, pela amizade, conselhos e palavras de incentivo em diversos momentos.

Ao meu co-orientador Professor Dr Marcel Spósito pela amizade e constante prontidão em me auxiliar com conselhos e sugestões acerca da realização deste trabalho.

À minha banca de acompanhamento, Prof^a Dr^a Patrícia Dalzoto e Dr Marcio Pie, pelas sugestões e contribuições oferecidas, cooperando para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha banca de defesa da dissertação, Dr Nelson Massola Júnior, Dr^a Ana Cláudia Bonatto e Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro, pelas sugestões, contribuições e correções que enriqueceram muito este trabalho.

À Professora. Dr^a Lygia Vitória Galli-Terasawa pela amizade, companheirismo e por diversas vezes ter me oferecido palavras de ânimo.

Aos Professores do Departamento de Genética, que contribuíram para minha formação.

Ao Professor Juarez Gabardo que além de amigo e incentivador, pode auxiliar nos resultados estatísticos deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Thelma Alvim que sempre se disponibilizou no auxílio a microscopia ótica.

À amiga Andressa Peres Bini pela amizade, dedicação e por ter estado ao meu lado na bancada e fora dela. Seu auxílio foi de grande importância e colaboraram muito para a realização deste trabalho.

Ao amigo Douglas Adamoski pela extrema bondade, dedicação e também por sua habilidade computacional que muito me auxiliou em diversas análises deste trabalho.

Ao amigo Eduardo Goulin pelo incentivo e sugestões que em diversos momentos colaboraram para a realização deste trabalho.

À amiga Danyelle Stringari pela grande ajuda, paciência e compreensão durante o processo de sequenciamento de DNA.

Aos meus queridos amigos do LabGeM Lisandra Santos Ferreira, Douglas Herrera Montenegro, Angela Cristina Ikeda, Josiane Gomes Figueiredo, Danyelle Stringari, Renata Gomes, Patricia Araújo Lopes, Fabiana Tonial, Douglas Adamoski, Eduardo Goulin, Andressa Peres Bini, Luciana Lange Bassani, Thabata Maria Alvarez, Diego Mazarin, Devânia Patrícia de Jesus, Vanessa Zulkiewicz, Rodrigo Schuh, Juliana Marta Muehlmann Fischer, Elisandro Bruscato que em diversas oportunidades puderam me auxiliar nas atividades do laboratório e fizeram os momentos de trabalho mais divertidos e agradáveis.

À querida D. Izolde Gaertner que por meio de seus auxílios técnicos fez o trabalho de laboratório ser mais fácil.

Aos amigos da Pós-Graduação Franciele Cabral Pinheiro, Shenia Pedro Bom, Paula Moiana da Costa, Juliane Mercer, Juliana Zanetti, Lisandra Santos Ferreira, Douglas Montenegro, Angela Ikeda, pela grande amizade excelente convivência e incentivos para a realização deste trabalho.

À Anilda Gomes da Silva, pelo eventual auxílio técnico na SEAD.

À Camila, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética que sempre prontamente me auxiliou com úteis informações facilitando os trâmites de documentos e cumprimento de prazos.

Ao colega Denis Marin, que gentilmente fez as coletas em campo das amostras de folhas para a realização deste trabalho.

À minha querida amiga Juliana Fabris que incentivou a me aventurar no mundo dos fungos ingressando no LabGeM, e assim encontrei uma das realizações da minha vida.

À querida amiga Juliane Mercer, que colaborou para meu ingresso no mestrado, quando este ainda era um sonho, com aulas e exercícios sobre Genética que me auxiliaram a conquistar a aprovação.

Aos meus queridos amigos Jaqueline e Marcelo, Juliana e Joaquim, Flávia e Daniel, casais incríveis por quem tenho muito carinho, pela torcida e apoio de sempre.

Aos meus queridos pais Pedro e Daisi pelo grande amor, ajuda constante em todos os sentidos, pelo incentivo e confiança; além de toda a educação que me proporcionaram para a construção do conhecimento que me possibilitou conquistar esta vitória.

Ao meu irmão Guilherme pelas diversas vezes que cuidou de seus queridos sobrinhos para eu poder me dedicar aos estudos.

Ao meu irmão Kristoferson e minha cunhada Mariana que mesmo longe me incentivaram e me apoiaram nesta jornada.

Aos meus queridos tios Nilo e Eliza que muito contribuíram para minha educação além de importantes palavras de incentivo em diversos momentos.

Aos meus sogros Cláudio e Noemi pelo apoio, incentivo, confiança e grande ajuda em diversos momentos.

Ao meu maravilhoso marido Clayson por todos os momentos de apoio, compreensão e carinho. E aos meus queridos filhos Tiago e João Pedro por suas palavra e gesto de amor que expressaram seus sentimentos de compreensão e incentivo para a concretização desta dissertação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

"O sonho é uma coisa maravilhosa. Existem sonhos que nos levam a um mundo só nosso, onde a imaginação atua e nós só precisamos aproveitar.

Existem sonhos que são objetivos que pretendemos alcançar. E quando alcançamos é algo inacreditável, pois lutamos para vivenciar este momento sempre esperado.

Um sonho seja acordado ou dormindo é sempre muito especial e neles vivemos os melhores momentos de nossas vidas."

Tiago Gabriel Waculicz Andrade (2009).

RESUMO

A citricultura brasileira vem sofrendo perdas na produção, em especial devido a doenças causadas por fungos e bactérias. A Podridão Floral ou “Queda Prematura dos Frutos Cítricos” (QPFC) é causada pela infecção de flores por fungos da espécie *Colletotrichum acutatum* Simmonds e acarreta a abscisão de frutos jovens. Ocorre nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas, principalmente em locais que propiciam mais de uma florada dos citros (*Citrus* spp.). A doença QPFC está presente em regiões do estado de São Paulo onde as condições climáticas são favoráveis. Tais regiões eram evitadas pelos citricultores para o plantio de variedades suscetíveis. O aparecimento do HLB (“Huang Long Bing”) ou “Citrus Greening” tem obrigado a migração dos pomares cítricos para regiões antes não utilizadas. Assim, é emergente a localização de áreas onde *C. acutatum* não esteja presente indicando possíveis locais de migração para as culturas citrícolas. A validação de métodos de diagnóstico para verificar se o fungo *C. acutatum* se apresenta de forma endofítica em plantas cítricas, é premente. Na literatura não há relatos da presença de linhagens não patogênicas de *C. acutatum* de forma endofítica; ou se está presente como patógeno latente em plantas cítricas entre as floradas ou mesmo em plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos, contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença. Assim, a colonização de plantas cítricas com linhagens não patogênicas de *C. acutatum*, geraria falsos positivos no diagnóstico *in vivo*. O isolamento e identificação de fungos do gênero *Colletotrichum* colonizando o interior de plantas cítricas e da vegetação espontânea de pomares com relatos da doença, Queda Prematura dos Frutos Cítricos, pode dirimir tais dúvidas. Estes esclarecimentos, servirão de base para a adoção de medidas de controle da doença. Inicialmente, o agente causal desta doença foi identificado como sendo *Colletotrichum gloeosporioides*. Posteriormente, estudos utilizando marcadores moleculares, constatou-se que o agente responsável pela doença é *C. acutatum*. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de *C. acutatum* como endofítico em plantas cítricas e vegetação espontânea presentes em pomares cítricos do Estado de São Paulo através de métodos moleculares como PCR espécie-específica e sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA. Foram realizados isolamentos de regiões do Estado de São Paulo, totalizando 120 isolados de citros e 43 de vegetação espontânea, identificados por PCR espécie-específica como *C. gloeosporioides*. A comparação de 80 sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA permitiu a identificação destes como pertencendo a espécie *C. gloeosporioides*. Entretanto, 22 isolados apresentaram uma região inicial de aproximadamente 50 nucleotídeos a mais sequenciados do que as demais linhagens utilizadas, inclusive as linhagens referência. Sendo possível observar variabilidade entre estes isolados, o que sugere a possibilidade da existência de mais de uma espécie pertencente ao complexo *C. gloeosporioides*.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, endofíticos, citros, vegetação espontânea, ITS, PCR.

ABSTRACT

Brazilian citrus culture has been suffering crop productivity reduction, especially because of diseases caused by fungi and bacteria. "Postbloom fruit drop" (PFD) disease is caused by the fungi *Colletotrichum acutatum* Simmonds which causes flowers infection and the abscission of young fruit. It occurs in the tropics and wet subtropics of America, mainly in places that provide more than one citric blooming (*Citrus* spp.). The PFD disease is present in regions of the São Paulo state with favorable climatic conditions. Citrus farmers used to avoid planting susceptible varieties in such regions, but the appearance of "Huang Long Bing" (HLB) or "Citrus Greening" has caused them to migrate the citric orchards to places not used before. Thus, it's emergent to find areas where *C. acutatum* is not present. The validation of these diagnostic methods to verify if the fungus *C. acutatum* is present endophytically in citric plants is urgent. There are no previous reports of the presence of non-pathogenic strains of *C. acutatum* endophytically nor if the species is present as a latent pathogen in citric plants between blooming or even in spontaneous vegetation in citric orchards that contributes as the inoculant reservoir for the spreading of the disease. Thus, the colonization of citric plants by non-pathogenic strains of *C. acutatum* would generate false positives in the *in vivo* diagnostic. Isolation and identification of fungi belonging to the genus *Colletotrichum* that colonize the interior of citric plants and orchard's spontaneous vegetation with previous reports of Premature Dropping of Citrus Fruits may cease such doubts. These clarifications will be ground rules for the adoption of measures to control that disease. Initially, the causal agent of this disease was identified as *C. gloeosporioides*. Despite of the great morphological similarity of colonies, using molecular markers it was realized that the agent responsible for the disease is *C. acutatum*. So, this work was aimed to verify the presence of *C. acutatum* as an endophytic in citric plants and spontaneous vegetation present in citric orchards from the state of São Paulo using molecular techniques such as species-specific PCR and sequencing of the region ITS1-5,8S-ITS2 from the rDNA. All the 120 isolates from citrus and the 43 from spontaneous vegetation were identified, by species-specific PCR, as *C. gloeosporioides*. The comparison of 80 ITS1-5,8S-ITS2 sequences allowed the identification of these as *C. gloeosporioides*. However, 22 isolates present an initial region of approximately 50 sequenced nucleotides more than other strains used, even reference strains. It was possible to observe variability among these isolates, which suggests the possibility of one more species belonging to the *C. gloeosporioides* complex.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, endophytic, spontaneous vegetation, ITS, PCR

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PÉTALAS DE CÍTROS APRESENTANDO LESÕES DE PODRIDÃO FLORAL CAUSADA PELO FUNGO <i>Colletotrichum acutatum</i>	19
FIGURA 2 – LESÕES EM BOTÕES FLORAIS E ASPECTO “ESTRELINHA”, CARACTERÍSTICOS DA DOENÇA PODRIDÃO FLORAL.	20
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS MUNICÍPIOS DE MOGI GUAÇÚ, BARRETOS E RINCÃO NO ESTADO DE SÃO PAULO	35
FIGURA 4 - REGIÃO DE HIBRIDIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO E PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA. ..	42
FIGURA 5 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES DE MOGI-GUAÇU/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUA)	50
FIGURA 6 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES DE BARRETOS/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUA)	53
FIGURA 7 – MACROMORFOLOGIA DAS 43 COLÔNIAS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA DE RINCÃO/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUA)	55
FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA DE CONÍDIOS DE 4 ISOLADOS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> PROVENIENTES DE PLANTAS CÍTRICAS (A,B) E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA (C,D).	57
FIGURA 9 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR DE 16 ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS CÍTRICAS UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> CGINT/ITS4 (A) ESPECÍFICOS PARA <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e Col1/ITS4 (B) ESPECÍFICOS PARA <i>C. boninense</i>	63
FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR DOS 43 ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA UTILIZANDO O PAR DE <i>PRIMERS</i> CGINT/ITS4 ESPECÍFICOS PARA <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	63
FIGURA 11 – FILOGRAMA BASEADO NA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO RDNA DE 70 ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. E 10 ISOLADOS REFERÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES: <i>C. gloeosporioides</i> (AM947679, AJ301988, AJ301986, EU552111, AJ301908, AJ301977), <i>C. fragariae</i> (AJ301912), <i>C. acutatum</i> (AJ301922), E <i>C. boninense</i> (EU822805) E	

FUNGO ENDOFÍTICO (FJ643579). VALORES DE BOOTSTRAP (1.000 REAMOSTRAGENS).....	65
FIGURA 12 - ALINHAMENTO DOS 50 NUCLEOTÍDEOS INICIAIS DA SEQUÊNCIA ITS DO RDNA DE 22 ISOLADOS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DESTACANDO O POLIMORFISMO OBSERVADO EM 6 ISOLADOS PROVENIENTES DE PLANTAS CÍTRICAS.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COORDENADAS GEOGRÁFICAS DAS PLANTAS DA FAZENDA ORIÇANGA EM MOGI-GUAÇÚ - SP.....	36
TABELA 2 – CÓDIGO DOS ISOLADOS E LOCALIZAÇÃO DAS PLANTAS PROVENIENTES DA FAZENDA CALIFÓRNIA EM BARRETOS – SP ...	37
TABELA 3 – CÓDIGO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA EM POMARES CÍTRICOS DE RINCÃO/SP	48
TABELA 4 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO, DIÂMETRO COLONIAL E TAMANHO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> ENDOFÍTICOS DE PLANTAS CÍTRICAS E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA, APÓS 5, 6 E 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA	58

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA Meio Batata Dextrose e Ágar

C. acutatum: *Colletotricum acutatum*

C. boninense: *Colletotrichum boninense*

C. gloeosporioides: *Colletotrichum gloeosporioides*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: Ácido etileno diamono tetracético

FGG: fast-growing gray

HLB: Huang Long Bing

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

KLA: Key lime anthracnose

Mg⁺⁺: Magnésio

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

NaOCl: hipoclorito de sódio

NJ: Neighbor Joining

qPCR :PCR quantitativa

QPFC: Queda Prematura dos Frutos Cítricos” (QPFC)

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PFC: Podridão Floral dos Citros (PFC)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

rDNA: DNA ribossomal

RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphism

TBE: Tris-Base, Ácido bórico, EDTA

RNA: Ácido ribonucléico

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SGO: slow-growing orange

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

UPGMA: *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS	18
3.2	MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	21
3.3	FUNGOS DO GÊNERO <i>Colletotrichum</i>	24
3.4	HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS	26
3.5	IDENTIFICAÇÃO POR MARCADORES MOLECULARES	28
3.5.1	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	28
3.5.2	Sequências ITS	29
3.5.3	Análise Filogenética	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	34
4.1.1	Linhagens fúngicas isoladas de citros.....	34
4.1.2	Linhagens fúngicas isoladas de plantas da vegetação espontânea.....	34
4.2	ISOLAMENTO DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Colletotrichum</i>	35
4.3	PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	38
4.4	OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS	39
4.5	IDENTIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	39
4.5.1	Caracterização Cultural	39
4.5.2	Caracterização Morfológica.....	40
4.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	41
4.6.1	Extração de DNA	41
4.6.2	Análise Por PCR Espécie-Específica	42
4.6.3	Análise por Sequenciamento da Região ITS1-5,8s-ITS2 do rDNA	43
4.6.3.1	Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA	43
4.6.3.2	Purificação da reação de PCR	44
4.6.3.3	Reação de Sequenciamento	44
4.6.3.4	Edição e Análise das Sequências.....	45
4.6.3.5	Análise Filogenética.....	45
4.7	MEIOS DE CULTURA	45
4.7.1	Meio BDA (Meio Ágar-Batata-Dextrose)	45
4.8	SOLUÇÕES E REAGENTES	46
4.8.1	Tampão de Corrida TBE 10X	46
4.8.2	Gel de Agarose (0,8%).....	46
4.8.3	Gel de Agarose (1,0%).....	46
4.8.4	Gel de Agarose (1,5%).....	47
4.8.5	Solução de Brometo de Etídeo	47
4.8.6	Tampão da Amostra (6X).....	47
4.8.7	Solução de Benzoato de Benzila.	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	ISOLAMENTO	48
5.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	49
5.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	62
5.3.1	Reações de PCR espécie-específica	62
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se na citricultura, sendo detentor de um terço da produção mundial e 85% da produção internacional do suco da fruta, representando uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, movimentando 2 bilhões de dólares por ano. A produção citrícola brasileira é de 17,7 milhões de toneladas ao ano, ocupando aproximadamente 1 milhão de hectares no território brasileiro e, deste total, 820 mil hectares localizam-se no Estado de São Paulo (AGRIANUAL, 2005).

O Estado de São Paulo tem no setor agrícola uma grande força econômica que corresponde a 20% da produção agrícola nacional. A atividade citrícola paulista movimenta mais de 5 bilhões de dólares por ano, sendo considerada a atividade principal em 316 municípios paulistas, gerando 400.000 empregos diretos, com mais de 3 mil frentes de trabalho simultâneas na fase de colheita. A citricultura de São Paulo é responsável por 87,7% da produção nacional e de 98% do suco concentrado exportado, ocupando uma área com 200 milhões de plantas, constituindo-se assim no maior parque citrícola do mundo (Relatório da Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo – dados de 2008).

Assim, é grande sua importância agroeconômica para o país, não podendo estar suscetível a grandes perdas, como as presentes em decorrência de epidemias da podridão floral, que mesmo esporádicas prejudicam quase a totalidade da produção (TIMMER *et al.*, 1994). A Podridão Floral ou “Queda Prematura dos Frutos Cítricos” (QPFC) é causada pela infecção de flores por fungos da espécie *Colletotrichum acutatum* Simmonds e acarreta a abscisão de frutos jovens (FEICHTENBERGER *et al.*, 2005). Ocorre nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas, principalmente em locais que propiciam mais de uma florada dos citros (*Citrus* spp.), ou seja, variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença.

A doença QPFC está presente em regiões do estado de São Paulo onde as condições climáticas são favoráveis. Tais regiões eram evitadas pelos citricultores para o plantio de variedades susceptíveis. O aparecimento do HLB (“Huang Long Bing”) ou “Citrus Greening”, relatado pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (IAC) e o Fundecitrus desde 2004, tem obrigado a migração dos pomares cítricos para regiões antes não utilizadas. Assim, é emergente a localização de áreas onde o

fungo *C. acutatum* não esteja presente, indicando possíveis locais para a migração das culturas citrícolas. Para validar métodos de diagnóstico a serem realizados é premente verificar se o fungo *Colletotrichum acutatum* não está presente de forma endofítica em plantas cítricas. Não há relatos na literatura da presença de linhagens não patogênicas de *C. acutatum* de forma endofítica nestas plantas. Desta forma, o presente trabalho visa verificar a ocorrência de colonização de plantas cítricas com linhagens não patogênicas de *C. acutatum*, o que geraria falsos negativos no diagnóstico *in vivo*. Por outro lado, não está claro na literatura se o fungo *C. acutatum* está presente como patógeno latente em plantas cítricas entre as floradas ou mesmo em plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos, contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença. O isolamento e identificação de fungos do gênero *Colletotrichum* colonizando o interior de plantas cítricas e da vegetação espontânea de pomares com relatos da doença, Queda Prematura dos Frutos Cítricos, pode dirimir tais dúvidas. Estes esclarecimentos, servirão de base para a adoção de medidas de controle da doença.

Inicialmente, o agente causal desta doença foi identificado como sendo *Colletotrichum gloeosporioides*. Posteriormente, estudos utilizando marcadores moleculares, constataram que o agente responsável pela doença é *C. acutatum*. Desta forma, métodos moleculares como PCR espécie-específica e sequenciamento de DNA são ferramentas úteis na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum*. A comparação de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA entre as espécies do gênero permitem a identificação de espécies tais como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense* (PILEGGI *et al*, 2009).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a uma determinada espécie hospedeira, bem como a determinação de sua variabilidade são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença.

2 OBJETIVOS

- Descartar a presença de linhagens não patogênicas do fungo *Colletotrichum acutatum* de forma endofítica em plantas cítricas, a fim de validar os métodos de diagnóstico propostos.
- Verificar se o fungo *C. acutatum* está presente como patógeno latente em plantas cítricas entre as floradas ou mesmo em plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos, contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença.
- Avaliar a diversidade das espécies de *Colletotrichum* isoladas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS

A Podridão Floral dos Citros (PFC) é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds, também conhecida por “Queda Prematura de Frutos Cítricos” (FAGAN, 1979; GOES; CRESTE, 2000). A doença é conhecida no Brasil, pelo menos desde 1977 em laranjas, quando foi inicialmente relatada no Rio Grande do Sul por Dornelles, após a queda de frutos atingirem proporções alarmantes com redução de 95% da safra daquele ano. Sendo posteriormente identificada em pomares de São Paulo, onde causou prejuízos importantes nas safras 77/78 e 90/91 (FEICHTENBERGER, 1991). Na Flórida, a doença foi constatada em 1983, causando grandes prejuízos na primavera de 1988, principalmente em pomares de laranjas de umbigo e de ‘Valência’ (SONODA, HEBB, 1991). Atualmente a doença atinge todos os municípios de São Paulo e outros Estados como Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Goiás, Pará, Sergipe e Amazonas (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003).

A infecção por *C. acutatum* ocorre apenas em pétalas de flores e origina acérvulos 4 a 5 dias após a instalação do fungo. Estes passam a produzir conídios em abundância, os quais são dispersos por respingos de chuvas para outras flores durante o período de floração. A disseminação da doença é fortemente dependente do regime de chuvas, quanto mais distribuídas durante a floração maior será a incidência da doença (FEICHTENBERGER MÜLLER; GUIRADO, 1997). Assim, locais com condições mais úmidas, com grande intensidade de chuvas e variedades de citros que propiciem mais de uma florada no ano favorecem o aparecimento da doença (FEICHTENBERGER, 1991). Segundo Agostini, Gottwald e Timmer, (1993) o orvalho e a neblina também propiciam infecções localizadas de flores, a partir de folhas ou outras flores infectadas. No Brasil, a doença é mais severa em laranja “Pera” (*C. sinensis* Osbeck), limões verdadeiros [*Citrus limon* (Linn.) Burm], em lima ácida “Tahiti” (*C. latifolia* Tanaka) e no limão “Galego” (*C. aurantifolia* Swingle) (FEICHTENBERGER, 1991).

Os sintomas iniciais mais evidentes da doença são lesões alaranjadas nas pétalas de flores abertas (TIMMER *et al.*, 1994). Condições climáticas favoráveis propiciam o desenvolvimento rápido do fungo comprometendo os tecidos da pétala, que ficam rígidos e secos, firmemente aderidos ao disco basal, diferentemente do que ocorreria com flores saudáveis, em que as pétalas caem logo após sua abertura (FIGURA 1). Essa sintomatologia levou à denominação da anomalia de “post-bloom fruit drop” ou “Queda Prematura dos Frutos Cítricos”.



FIGURA 1 – PÉTALAS DE CÍTROS APRESENTANDO LESÕES DE PODRIDÃO FLORAL CAUSADA PELO FUNGO *Colletotrichum acutatum*. (FONTE: FUNDECITRUS)

Quando há incidência severa da doença as lesões podem ocorrer antes mesmo da abertura das flores, provocando podridão completa dos botões florais. Frequentemente, observa-se a necrose do pistilo, iniciando-se no estigma e descendo pelo estilo. Crescimentos fúngicos alaranjados podem também ser vistos nos estiletes dos estames, no estigma, estilo, ou no nectário (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997). Os discos basais, os cálices e os pedúnculos ficam aderidos aos ramos formando estruturas que recebem o nome de “estrelinhas”, enquanto os frutos recém-formados apresentam uma descoloração amarelo-pálida e caem rapidamente (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997) (FIGURA 2).



FIGURA 2 – LESÕES EM BOTÕES FLORAIS E ASPECTO “ESTRELINHA”, CARACTERÍSTICOS DA DOENÇA PODRIDÃO FLORAL. (FONTE: FUNDECITRUS)

O mecanismo envolvido na queda prematura, causada por *C. acutatum*, tem sido atribuído a um desequilíbrio nos níveis hormonais intracelulares de regulação do crescimento da planta (CHEN *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2003; LAHEY *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2003). Inicialmente suspeitou-se que o causador da queda prematura fosse uma anomalia fisiológica, o que levou pesquisadores a avaliar a aplicação de produtos com ação hormonal, como 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético que pode atuar como mimetizador de auxinas), no controle da doença (WEIR; PHELPS, 1968, citados por FAGAN, 1984). Muito embora esses produtos tenham apresentado resultado na maior retenção de frutos, a descoberta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* como agente causal da doença, alterou a maneira de controle da doença voltando-se para o uso de fungicidas. A elevada eficiência de fungicidas como o captafol e benomil, utilizados em mistura ou não, manteve a doença sob controle nos locais em que ela se tornou endêmica (FAGAN, 1984).

Em um minucioso estudo sobre isolados de *C. gloeosporioides* de plantas cítricas, Agostini e Timmer (1992) identificaram três estirpes com características morfológicas e patogênicas distintas: FGG (“fast-growing gray”), com rápido crescimento em meio de cultura, coloração acinzentada e incapaz de causar podridão floral; SGO (“slow-growing orange”), com crescimento lento em meio de cultura e patogênica em botões florais, e KLA (“Key lime anthracnose”), com características morfológicas semelhantes à estirpe SGO e associada à antracnose do limão galego. Apenas em 1996 Brown *et al.* com o uso de marcadores moleculares e meios seletivos, reclassificaram as estirpes SGO e KLA como *Colletotrichum acutatum* e as diferenciou da estirpe FGG, *C. gloeosporioides*, com

epidemiologia também distinta. A podridão floral dos citros é a única doença, dentre as causadas por *C. acutatum*, na qual alguns sintomas são induzidos por hormônios da planta (LI *et al.*, 2003; LAHEY *et al.*, 2004). A queda precoce de frutos ocasionada pela doença, tem como característica manter o pedúnculo e o cálice retidos à planta, sintomas muito característicos e de fácil identificação.

De acordo com Li *et al.* (2003) a infecção por *C. acutatum* é capaz de induzir a expressão de genes da planta que codificam proteínas relacionadas a biossíntese de etileno e ácido jasmônico.

3.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A presença de microrganismos em partes aéreas de plantas, em geral, é associada a sintomas que promovem algum prejuízo ao tecido vegetal. Entretanto, a presença de fungos em tecidos assintomáticos tem sido relatada em vários estudos, colonizando o interior dos tecidos vegetais sem causar dano aparente ou o aparecimento de sintomas de doenças. Tais microrganismos receberam a denominação de fungos endofíticos ou endófitos.

Bary, em 1866, introduziu o termo endófito, citado por Stone (1988), sendo aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações de antagonistas ou simbiotes. Carroll (1988), no entanto restringiu o uso do termo endofítico, aplicando somente para organismos que em seu processo de colonização não causam sintomas ao hospedeiro, desta forma excluindo os organismos patogênicos e mutualísticos.

Petrini em 1986, constatando a presença de fungos endofíticos em diversas espécies vegetais pode sugerir que todas as plantas têm potencial para serem hospedeiras destes microrganismos. Descobertas de diferentes aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros levaram Petrini a propor uma abrangência maior para o termo endófito, assim incluindo todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

Assim, microrganismos endofíticos são aqueles que passam todos ou uma parte de seu ciclo de vida colonizando entre e/ou intracelularmente os tecidos da

planta hospedeira, tipicamente sem causar sintomas aparentes de doença (PETRINI, 1991; CABRAL, STONE; CARROLL, 1993; BACON; WHITE, 2000; TAN; ZOU, 2001; NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

A diferenciação entre endofíticos, epifíticos (aqueles microrganismos que vivem na superfície da planta) e fitopatogênicos (aqueles que causam doenças às plantas) depende do nicho ocupado em determinado estágio e da interação do microrganismo com o hospedeiro (STROBEL *et al.*, 2004), portanto a aplicação destes termos tem puro significado didático, havendo dificuldade em determinar limites entre eles (AZEVEDO; SERAFINE; BARROS, 2002).

Comumente de um único vegetal podem ser obtidos de dezenas a centenas de isolados e, a partir de um único hospedeiro, pelo menos uma espécie pode se mostrar específica, confirmando o fato que os endofíticos são importantes componentes da diversidade microbiana (TAN; ZOU, 2001; STROBEL; DAYSE, 2003). Os endófitos interagem com diversos tipos vegetais como plantas herbáceas (TAESHOWISAN; PEBERDY; LUMYONG, 2003), plantas de florestas tropicais (STROBEL, 2002), plantas medicinais (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; PILEGGI *et al.*, 2009) e plantas aquáticas (CHEN *et al.*, 2003).

Os mecanismos usados por fungos endofíticos no processo de colonização da planta ainda não são totalmente conhecidos, mas inúmeros fatores envolvidos neste processo, provavelmente são similares aos que ocorrem com fungos patogênicos. A colonização pode ter sua origem pela infecção de sementes ou zona radicular, através de pecíolo, micélios de fungos epifíticos que entram na planta por meio de raízes, hidatódios, e estômatos; ou ainda o hospedeiro pode apresentar feridas deixadas por patógenos e insetos, que permitem a entrada de microrganismos (PEIXOTO-NETO; SERAFINE; BARROS, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; MARINHO *et al.*, 2005; JOHRI, 2006).

Este mecanismo ainda pode ocorrer de forma ativa pelo endófito, através da produção de enzimas ou estruturas especializadas que facilitam sua penetração no hospedeiro. Uma destas estruturas é o apressório (KUBO *et al.*, 1996), que pode estar pigmentado por melanina, que causa uma pressão hidrostática facilitando a entrada no hospedeiro, como o que ocorre em algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* (SHAW; KUO; HOCH, 1998). A colonização endofítica pode ser intracelular e limitada a poucas células, intercelular e localizada ou ainda inter e intracelular sistêmica e pode se desenvolver em qualquer tecido ou órgão do

vegetal: raiz, caule, ramos, folhas, flores e frutos (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; MARINHO *et al.*, 2005; JOHRI, 2006).

Os endófitos podem ainda, desempenhar relevante função para a sanidade do vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, no controle de insetos e até mesmo protegendo a planta contra herbívoros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002). Microrganismos que beneficiam e colonizam o interior do hospedeiro e que formam estruturas visíveis são intensamente estudados. Este é o caso das bactérias fixadoras de nitrogênio que formam nódulos em raízes e os fungos micorrízicos que entre outros efeitos benéficos, aumentam a absorção dos nutrientes pelos seus hospedeiros. No final dos anos 70, vários estudos demonstraram que os microrganismos endofíticos possuíam algumas funções imprescindíveis para a defesa de seus hospedeiros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002).

Figueiredo *et al.* (2007) relataram a presença de fungos do gênero *Pestalotiopsis* sp como endofíticos da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* no Brasil, com atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. A capacidade de colonizar tecidos internos de hospedeiros fez com que os endófitos se tornassem valiosos para a agricultura como uma ferramenta para melhorar o desempenho da produção agrícola (AZEVEDO *et al.*, 2000).

O processo de isolamento de endófitos exige cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, os epífitos. A desinfestação da superfície das folhas, caules e outros órgãos vegetais é uma etapa fundamental para o adequado isolamento destes microrganismos. Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfetante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares para a adequação da metodologia de isolamento, para que apenas os microrganismos epifíticos, mas não os endofíticos sejam eliminados (BLANCO, 1999). Os meios de cultura devem ser apropriados, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que restringem o crescimento de fungos. Outras variáveis igualmente importantes devem ser levadas em consideração, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, a temperatura de incubação das placas para

o isolamento, além da recorrência do isolado, revelando o seu verdadeiro estado endofítico (PETRINI, 1991; GOES; KIMATI, 1997; AZEVEDO, 1998).

3.3 FUNGOS DO GÊNERO *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* apresenta similaridade genética com taxons que compreendem endofíticos, saprofíticos e fungos patogênicos de plantas (KUMAR *et al.*, 2004; PHOTITA *et al.*, 2004). Espécies de *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e são os causadores de uma diversidade de doenças conhecidas como antracnose. Tais doenças podem causar considerável perda em um grande número de culturas como em cereais, café e legumes (BAILEY; JEGGER, 1992; LENNÉ, 1992), antracnose pós-colheita de frutos tropicais como o abacate, banana, manga (MORDUE, 1967; JEFFRIES *et al.*, 1990) e citros (FISHER; LOURENÇO; AMORIM, 2008); também queda prematura dos frutos cítricos (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003), além de serem encontrados em frutos caídos de plantas silvestres (TAN; HYDE; CORLETT, 2003).

Espécies de *Colletotrichum* que causam sérias doenças em plantas são comumente isolados como endofíticos de plantas saudáveis, e têm sido identificados também como saprofíticos em matéria morta de plantas (PHOTITA *et al.*, 2001a, 2004; PROMPUTTHA *et al.*, 2002; TOOFANEE; DULYMAMODE, 2002; KUMAR; HYDE, 2004).

Há vários relatos na literatura identificando isolados endofíticos, saprofíticos e muitos patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* ou *Colletotrichum* spp. (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1998; BUSSABAN *et al.*, 2001; PHOTITA *et al.*, 2001b; PROMPUTTHA *et al.*, 2002). *Colletotrichum gloeosporioides* é um endófito comumente isolado de uma grande variedade de espécies de plantas (RODRIGUES, 1994; BROWN *et al.*, 1998; BUSSABAN *et al.*, 2001; PHOTITA *et al.*, 2001b).

A caracterização e determinação taxonômica de *Colletotrichum* spp eram tradicionalmente realizados com base em caracteres morfológicos e culturais. Análise da morfologia de conídios e apressórios, presença de setas e do teleomorfo *Glomerella*, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento,

são características normalmente observadas (SMITH; BLACK, 1990; SUTTON, 1992). Tais características são ainda utilizadas para identificação e estudo da variabilidade de *Colletotrichum* spp, embora sejam empregadas como ferramenta adicional (ABANG, *et al.* 2002; PERES *et al.* 2002; TALHINHAS *et al.*, 2002; TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006; ANDRADE *et al.* , 2006; PILEGGI *et al.*, 2009).

A alta variabilidade de *Colletotrichum* spp sob diferentes condições de cultivo, a falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos e a plasticidade dos fungos pela preferência por seus hospedeiros tem tornado a análise apenas de caracteres morfológicos não confiáveis na identificação de isolados deste gênero (SUTTON, 1992; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). A diferenciação entre espécies com base no círculo de hospedeiros ou hospedeiro de origem também não são critérios confiáveis. É frequente a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada a uma mesma hospedeira e uma mesma espécie pode estar presente em múltiplas hospedeiras (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Como exemplo, *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* , em geral, apresentam sintomas semelhantes como as podridões de frutos em pós-colheita (PERES *et al.*, 2002).

Uma das principais limitações da classificação de espécies com base apenas em caracteres morfológicos é que a variação apresentada pelos indivíduos pode não representar espécies diferentes, e sim uma variabilidade fenotípica dentro da mesma espécie. E da mesma forma, indivíduos com características morfológicas semelhantes podem representar espécies diferentes. Especialmente quando traços fenotípicos similares estão presentes em vários grupos distintos (VINNERE, 2004).

Desta forma técnicas moleculares são métodos alternativos para o estudo taxonômico sendo importantes ferramentas para a resolução de problemas na delimitação de uma espécie (MACLEAN *et al.*, 1993) e são ferramentas úteis na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* (LOPEZ, 2001; AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2006; PILEGGI *et al.*, 2009).

A comparação de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero levaram ao desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) taxon-específicos para a diferenciação entre espécies do gênero *Colletotrichum* por PCR (reação da polimerase em cadeia)

(MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992). Esses *primers* têm sido utilizados para a confirmação da identidade de isolados patogênicos a diversas espécies hospedeiras (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001; AFANADOR-KAFURI, 2003; MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003; TOZZE JUNIOR, 2007; WACULICZ-ANDRADE, 2007; PILEGGI *et al.*, 2009).

A identificação das espécies de *Colletotrichum* presentes em uma determinada planta hospedeira, bem como a determinação de sua diversidade, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle de doenças, além de propiciar um melhor entendimento da sua epidemiologia.

3.4 HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS

A presença de plantas da vegetação espontânea dentro de áreas agrícolas pode representar prejuízos, pois as mesmas podem servir como hospedeiras intermediárias para pragas e patógenos (LORENZI, 2000; MILEO *et al.*, 2006). A caracterização destas plantas se dá pela alta capacidade reprodutiva, por crescerem em lugares inóspitos, por apresentarem dispersão de sementes pelo vento, pelo hábito agressivo, resistência ao controle químico e pela ocupação de extensas áreas. O conjunto destes fatores permitem que essas plantas sirvam de potenciais fontes de inóculo de fitopatógenos para as plantações de espécies comerciais (CHAVES *et al.*, 2003).

As espécies de plantas pertencentes às famílias Asteraceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Commelinaceae, Solanaceae, Fabaceae, Plantaginaceae, Malvaceae e Tropaeolaceae já foram descritas como hospedeiras naturais de fitovírus (CHAVES *et al.*, 2003). Ainda, estudos mostram que 15% dos fitovírus já identificados no mundo foram descritos em espécies da vegetação espontânea (CHAVES *et al.*, 2003).

Batista (1984) estudou plantas daninhas presentes em cultivos de guaranazeiro. Tal cultivo tem o fungo *Colletotrichum guaranicola* como causador da antracnose, principal doença desta cultura. O estudo revelou a presença desse fungo nas plantas daninhas existentes no cultivo. Segundo Mileo *et al.* (2007), há

ainda presença de espécies de plantas daninhas mais suscetíveis, as quais servem de fonte de inóculo e de disseminação da antracnose, nas áreas onde há a cultura do guaranazeiro. Estudos das plantas de vegetação espontânea, como as plantas daninhas, associadas com o fungo são de fundamental importância para epidemiologia e controle da doença.

Ainda há relatos na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), onde as plantas daninhas foram encontradas como hospedeiras alternativas de begomovírus. Arnaud *et al.* (2007) identificaram begomovírus, através de PCR e ELISA, nas plantas daninhas existentes na cultura, reforçando a idéia de que a transmissão do vírus dos hospedeiros alternativos para o tomateiro é possível.

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd. é o causador da ferrugem asiática, uma doença com grande relevância na cultura de soja, uma vez que causa muitas perdas na produção, inviabilizando a colheita. Esse patógeno sobrevive apenas em tecidos vivos, sendo assim, hospedeiros alternativos podem servir de fonte de inóculo inicial para a cultura da soja, pois permitem a sobrevivência do fungo (SOUZA, 2007). Souza (2007) inoculou esporos do fungo em 9 espécies de leguminosas empregadas como adubo verde, e todas desenvolveram sintomas, confirmando o potencial desses hospedeiros alternativos em servirem de fonte de inóculo para a soja.

Muitas doenças podem ser influenciadas pela presença de plantas daninhas. Menezes (1999) relatou algumas dessas doenças em feijão como o mosaico dourado, tombamento, podridão cinzenta do caule, galha das raízes e mofo branco. As plantas hospedeiras são: leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), guanxuma (*Sida* spp.), corda de viola (*Ipomoea* spp.), trapoeraba (*Commelina benghalensis*), picão preto (*Bidens pilosa*), carrapicho-rasteiro (*Acanthospermum australe*), tiririca (*Cyperus esculentus*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum*), erva-de-santa-luzia (*Chamaesyce hirta*) e quebra-pedra (*Phyllanthus tenellus*). Em monoculturas como a do feijão, a rotação de cultura é bastante empregada e as plantas hospedeiras servem de reservatório para os patógenos nesse período (COBUCCI; STEFANO; KLUTHCOUSKI, 1999).

3.5 IDENTIFICAÇÃO POR MARCADORES MOLECULARES

A identificação precisa de microrganismos patogênicos é de fundamental importância na fitopatologia, na ciência médica, em estudos ambientais e no controle biológico. A identificação precoce do agente causal é primordial para se buscar mais rapidamente medidas de controle e prevenção das doenças de plantas (ATKINS; CLARK, 2004).

Tradicionalmente, a identificação de fungos filamentosos está baseada principalmente em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. No entanto, esse método exige tempo e nem sempre apresenta resultados precisos, muitas vezes levando a incorreto diagnóstico e interpretação dos resultados (ATKINS; CLARK, 2004). Desta forma faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos rápidos, sensíveis e precisos de diagnóstico.

Métodos de rápida identificação de fungos, baseados em biologia molecular, vêm sendo cada vez mais utilizados, como os métodos imunológicos, tecnologia de sonda de DNA/RNA e a tecnologia da PCR (Polymerase Chain Reaction) (ATKINS; CLARK, 2004). Variações desta última, como PCR quantitativa (qPCR), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) vem sendo utilizadas com sucesso na identificação e quantificação de espécies de fungos em diferentes amostras ambientais (DEAN *et al.*, 2005).

3.5.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Uma importante ferramenta molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) descrita na década de 80 por Kary Mullins, vem sendo cada vez mais utilizada por permitir a amplificação *in vitro* de uma sequência específica do DNA, de forma rápida e eficiente, eliminando a necessidade de clonar tais segmentos (MICKLOS; FREYER; CROTTY, 2005).

A aplicação desta técnica permite obter um grande número de cópias de uma determinada sequência de DNA através da amplificação enzimática (MULLIS; FALOONA, 1987). Os componentes necessários para que a reação ocorra são: os

oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) adenina, timina, guanina e citosina, DNA polimerase (*Taq polimerase*) e o magnésio (Mg^{++}), co-fator para a atuação da DNA polimerase. A reação de PCR consiste em múltiplos ciclos de três etapas: a desnaturação, a hibridização dos *primers* e a extensão, permitindo obter múltiplas cópias da sequência alvo.

A técnica de PCR apresenta-se largamente difundida. Os marcadores moleculares baseados em PCR têm sido de grande importância, pois através deles pode-se diagnosticar doenças infecciosas (através da amplificação do DNA do patógeno), estudar evolução molecular, utilizar na medicina forense. Através da PCR, é possível obter um resultado rápido, altamente específico, utilizando-se pequenas quantidades de DNA, sendo possível testar as amostras diretamente, sem a necessidade de cultura (ATKINS; CLARK, 2004). A PCR tem se demonstrado uma importante ferramenta na detecção, identificação e na taxonomia molecular de muitos microrganismos patogênicos (DEAN *et al.*, 2005; BEZUIDENHOUT; PRINSLOO; VAN DER WALT, 2006).

Alguns fatores são importantes para o sucesso da reação como a complexidade do genoma a ser estudado, a qualidade do DNA, o tamanho do fragmento a ser amplificado, a concentração de sais, a quantidade de cloreto de magnésio necessária para a síntese e o pH ideal para a enzima *Taq* DNA polimerase (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2003).

Para o desenvolvimento dos *primers* específicos da PCR, é necessária a seleção do DNA alvo, que pode ser através de sequências específicas existentes em bases de dados, ou também através da clonagem e sequenciamento de partes arbitrárias do genoma do fungo.

3.5.2 Sequências ITS

A tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético clássico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, para a análise genética direta da variação na sequência de DNA. Um

grande número de estudos tem utilizado sequências do DNA ribossômico (rDNA) com diversas aplicações na genética, evolução e melhoramento, podendo ser utilizado para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. Este interesse está diretamente relacionado à estrutura desta região, que se encontra em locais específicos do genoma, e repetida em sequência inúmeras vezes.

Ao contrário de outras sequências repetitivas que aparentemente não tem função conhecida no genoma, a função do rDNA é a de codificar as diferentes moléculas do RNA ribossômico, representando extrema importância no processo de tradução de proteínas. Em geral, as regiões 28S, 18S e 5,8S das unidades de repetição, não apresentam variações de sequência, enquanto que as regiões internas que são transcritas, conhecidas como ITS (Internal Transcribed Spacer), variam enormemente. Desta forma, as sequências codificantes do rDNA evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes (ITS), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo assim, de grande interesse nos estudos filogenéticos a níveis de gêneros, espécies e populações (WHITE; MORROW, 1990).

Afanador-Kafuri *et al.* (2003) utilizando tais sequências, foram hábeis em diferenciar espécies de *Colletotrichum* presentes em tamarillo, passiflora e manga. Moriwaki, Sato e Tsukiboshi (2003) descreveram, por meio da análise destas sequências, uma nova espécie, *Colletotrichum boninense* estudando um grupo heterogêneo de isolados no Japão, inicialmente identificados como *C. gloeosporioides*.

Pileggi *et al.* (2009) por meio de PCR espécie-específica e sequenciamento da região ITS identificaram isolados pertencentes as espécies *C. gloeosporioides* e *C. boninense* como endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart . ex Reiss.

Lubbe *et al.* (2004) identificaram a presença de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. crassipes* e *C. boninense* presentes em *Proteaceae*. Em 2005, Farr *et al.* utilizando esta mesma abordagem molecular diferenciaram espécies de *Colletotrichum* em *Agavaceae*.

3.5.3 Análise Filogenética

Desde que a informação necessária para o funcionamento dos organismos está no DNA, ou RNA em alguns vírus, pode-se realizar estudos de parentesco evolutivo dos mesmos pela comparação das sequências presentes no ácido desoxirribonucléico. Este método possui diversas vantagens sobre os métodos clássicos baseados em características morfológicas e fisiológicas (NEI; KUMAR, 2000). Desde que as alterações evolutivas do DNA seguem um padrão relativamente regular, é possível utilizar modelos matemáticos para formular a taxa de mudança e comparar DNAs de organismos distantemente relacionados. Além disso, o genoma de todos os organismos consiste de longas sequências de nucleotídeos, contendo, portanto, uma quantidade muito maior de informações filogenéticas que características morfológicas. Por essas razões, filogenias moleculares podem clarificar muitos padrões de ramificação da árvore da vida, os quais tem sido difíceis de interpretar por metodologias clássicas (NEI; KUMAR, 2000). Entretanto, deve-se ter cuidado ao optar pelo método que mais condiz com determinada situação, de forma a evitar erros sistemáticos. Os métodos mais comumente usados são classificados em três grupos principais: métodos de distância, métodos de parcimônia, e métodos de máxima verossimilhança.

Nos métodos de distância, ou métodos de matrizes de distância, a divergência entre duas sequências (DNA, RNA ou proteína) é expressa como a fração dos sítios que diferem entre tais sequências em um alinhamento. De maneira geral, quanto mais similar entre si for um par de sequências, estas serão mais próximas evolutivamente. Também, quanto mais tempo se passa desde a divergência de dois organismos (isto é, duas sequências) a partir de um ancestral comum, maior será o percentual de diferenças entre as sequências correspondentes. Embora esta última suposição pareça lógica, nem sempre é verdadeira, pois algumas linhagens podem evoluir mais rapidamente que outras; mesmo se duas linhagens evoluam com a mesma velocidade, ou seja, com a mesma taxa de mutações, tal suposição talvez seja falsa devido a múltiplas substituições (HALL, 2001). Devido a estas peculiaridades, muitas vezes os métodos de distância subestimam a real quantidade de mudanças (mutações) ao longo das linhagens. A forma mais simples de determinar a distância entre sequências

homólogas de DNA, ou de proteínas, é através da proporção de sítios nos quais duas sequências são diferentes, em relação ao total de nucleotídeos, ou aminoácidos. Essa proporção, conhecida como distância p , pode ser facilmente estimada pela relação $p=n_d/n$, onde n_d representa a quantidade de sítios divergentes entre duas sequências com n nucleotídeos, ou aminoácidos (NEI; KUMAR, 2000).

A partir de dados obtidos por modelos matemáticos de distância, podem ser construídas árvores filogenéticas de distâncias. Diversos modelos computacionais realizam esse trabalho, sendo que os mais populares são o UPGMA ("*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*") e Neighbor Joining (NJ) (HALL, 2001). Estes usam uma série específica de cálculos, através de métodos algorítmicos, para estimar uma árvore filogenética, a partir de uma matriz de distâncias calculadas com sequências de DNA ou proteínas. Tais cálculos envolvem a manipulação de uma matriz de distância, a qual é derivada de um alinhamento múltiplo de sequências. Iniciando com tal alinhamento, ambos os programas calculam a distância (ou seja, a fração de diferenças), para cada par de sequências e acumulam esses dados numa matriz de dados.

O método UPGMA é um método de agrupamento (*clustering*) que está embutido na suposição de que as árvores filogenéticas construídas são aditivas, ou seja, são ultraméricas, de forma que todos os táxons (ou sequências) são igualmente distantes de um grupo externo ("raiz"), e que a distância de grupos irmãos a seu ancestral comum é idêntica, suposições que são pouco prováveis de serem verdadeiras. Por esse motivo, e outros detalhes, UPGMA é raramente usado atualmente. O método Neighbor Joining é similar ao UPGMA na manipulação dos dados em matrizes de distância, entretanto, ele não constrói agrupamentos (*clusters*), mas calcula diretamente a distância em relação a nós internos da árvore filogenética. NJ não assume que todos os táxons sejam equidistantes da raiz, dessa forma, a distância de táxons irmãos, a um determinado nó (ancestral comum), pode ser diferente (HALL, 2001). Os demais métodos, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, são baseados na análise do estado de caracteres e não em matrizes de distância. Eles utilizam os múltiplos alinhamentos diretamente, através da comparação dos estados dos caracteres dentro de cada coluna (cada posição) no alinhamento.

Os métodos de parcimônia foram originalmente desenvolvidos para caracteres morfológicos, e existem muitas versões diferentes (NEI; KUMAR, 2000).

A parcimônia é baseada na suposição que a topologia (árvore) mais provável é aquela que requer o menor número de mudanças para explicar um determinado alinhamento. A premissa básica desse método é que os táxons (sequências) compartilham características comuns porque eles herdaram tal característica de um ancestral comum. Esse método é intuitivo porque ele satisfaz a noção de que o cenário evolutivo mais provável é aquele que requer o menor número de eventos (os eventos nesse caso são mutações). Através desse método, frequentemente são geradas inúmeras árvores filogenéticas sutilmente diferentes, as quais são consistentes com o mesmo número mínimo de eventos evolutivos, e, portanto, igualmente parcimoniosas (HALL, 2001).

Nos métodos de Máxima Verossimilhança, observando um determinado conjunto de dados de sequências, e considerando um determinado modelo evolutivo, a probabilidade é maximizada para cada topologia, sendo que a topologia que apresenta a máxima verossimilhança (maior probabilidade de ser verdadeira) é escolhida como o modelo final. Ou seja, esse método procura pela topologia que, sob algum modelo evolutivo pré-determinado, maximize a verossimilhança (possibilidade) dos dados observados (HALL, 2001). Esse método quase sempre produz uma única árvore. A vantagem é que ele permite especificar o modelo evolucionário para um determinado conjunto de dados (alinhamento), de forma que a possibilidade da árvore resultante ser verdadeira é previamente conhecida. Entretanto, uma desvantagem da máxima verossimilhança é que ela é bem mais lenta que métodos de distâncias ou parcimônia, sendo muitas vezes necessárias semanas para a realização da análise.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1 Linhagens fúngicas isoladas de citros

Foram realizadas duas coletas de folhas saudáveis de citros de pomares localizados no Estado de São Paulo nos meses de Janeiro e Fevereiro de 2009. Os dados pertencem a plantios de 1994 e 1999 de laranja "Valência", enxertada sobre limão "Cravo" provenientes das Fazendas Oriçanga em Mogi Guaçu e Califórnia em Barretos, respectivamente (FIGURA 3).

4.1.2 Linhagens fúngicas isoladas de plantas da vegetação espontânea

Foram realizadas quatro coletas de folhas saudáveis da vegetação espontânea entre os meses de junho e novembro de 2008, presentes em pomares cítricos da Fazenda Santa Helena no município de Rincão-SP (FIGURA 3).

As plantas utilizadas foram: Agriãozinho (Poiazinha) (*Synedrellopsis grisebachii*), Apaga-Fogo (*Alternanthera tenella*), Beldroega (*Portulaca oleracea*), Bosta de Banana (Tibet, Carrapicho) (*Cenchrus echinatus*), Brachiária (*Brachiaria* sp), Buva (*Conyza bonariensis*), Capim Colchão (*Digitaria horizontalis*), Capim Margoso (*Digitaria insularis*), Capim Sempre-Verde (*Panicum maximum* variedade Gongyloides var.), Carrapicho Arroz Bugre (Caruru) (*Amaranthus deflexus*), Capim Coloninho (*Echinochloa colonum*), Erva de Santa Luzia (*Chamaesyce hirta*), Falsa Serralha (*Emilia sonchifolia*), Capim Favorito (*Rhynchelytrum repens*), Guanxuma (*Sida rhombifolia*), Maria Pretinha (*Solanum americanum* Mill), Pé-de-Galinha (*Eleusine indica*), Picão Preto (*Bidens pilosa*), Poaia (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard), Trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e Vassoura (*Sida* sp.).



FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS MUNICÍPIOS DE MOGI GUAÇÚ, BARRETOS E RINCÃO NO ESTADO DE SÃO PAULO (FONTE: IBGE – MODIFICADO PELO AUTOR)

4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS DO GÊNERO *Colletotrichum*

Para o isolamento dos endófitos de citros foram coletadas 3 folhas com pecíolos de 60 plantas devidamente identificadas com coordenadas geográficas, como mostram as tabelas 1 e 2. Essas folhas foram acondicionadas em sacos plásticos etiquetados e encaminhados ao Laboratório de Genética de Microrganismos - LabGeM - UFPR, respeitando prazo máximo de 24 horas após sua coleta.

Para o isolamento de endófitos de plantas da vegetação espontânea foram coletados diferentes números de folhas para cada tipo de planta, dependendo da disponibilidade e tamanho das mesmas. Todas as folhas apresentavam pecíolos e foram devidamente acondicionadas, identificadas e remetidas ao mesmo laboratório mencionado acima. Porém, como apresentam uma grande dispersão no pomar suas coordenadas geográficas não foram registradas.

TABELA 1 – COORDENADAS GEOGRÁFICAS DAS PLANTAS DA FAZENDA ORIÇANGA EM MOGI-GUAÇÚ - SP

Código do isolado	Localização da Planta			Código do isolado	Localização da Planta		
	Latitude	Longitude	Altitude (m)		Latitude	Longitude	Altitude (m)
LGMF501	-22,3042	-47,0107	588,8	LGMF531	-22,3036	-47,0119	571,3
LGMF502	-22,3041	-47,0108	590,1	LGMF532	-22,3035	-47,0120	576,2
LGMF503	-22,3040	-47,0109	596,0	LGMF533	-22,3035	-47,0120	580,9
LGMF504	-22,3040	-47,0109	595,6	LGMF534	-22,3035	-47,0120	583,5
LGMF505	-22,3040	-47,0109	595,6	LGMF535	-22,3035	-47,0121	582,2
LGMF506	-22,3040	-47,0110	590,5	LGMF536	-22,3035	-47,0121	579,3
LGMF507	-22,3040	-47,0110	591,3	LGMF537	-22,3035	-47,0121	577,4
LGMF508	-22,3040	-47,0110	590,3	LGMF538	-22,3035	-47,0121	577,4
LGMF509	-22,3040	-47,0111	587,5	LGMF539	-22,3035	-47,0121	577,4
LGMF510	-22,3039	-47,0111	596,8	LGMF540	-22,3034	-47,0123	577,7
LGMF511	-22,3039	-47,0111	596,8	LGMF541	-22,3034	-47,0123	577,3
LGMF512	-22,3039	-47,0112	594,5	LGMF542	-22,3034	-47,0123	580,9
LGMF513	-22,3039	-47,0112	593,9	LGMF543	-22,3034	-47,0123	580,0
LGMF514	-22,3039	-47,0113	597,8	LGMF544	-22,3034	-47,0124	581,4
LGMF515	-22,3039	-47,0113	595,0	LGMF545	-22,3034	-47,0124	580,1
LGMF516	-22,3039	-47,0113	594,9	LGMF546	-22,3033	-47,0124	580,1
LGMF517	-22,3039	-47,0113	594,9	LGMF547	-22,3033	-47,0124	580,1
LGMF518	-22,3038	-47,0114	583,6	LGMF548	-22,3033	-47,0124	580,1
LGMF519	-22,3038	-47,0115	581,7	LGMF549	-22,3032	-47,0125	600,9
LGMF520	-22,3038	-47,0115	583,8	LGMF550	-22,3032	-47,0126	604,3
LGMF521	-22,3037	-47,0116	583,2	LGMF551	-22,3032	-47,0126	604,3
LGMF522	-22,3037	-47,0116	584,0	LGMF552	-22,3032	-47,0126	604,3
LGMF523	-22,3037	-47,0116	583,2	LGMF553	-22,3032	-47,0127	595,5
LGMF524	-22,3037	-47,0117	587,3	LGMF554	-22,3032	-47,0127	595,6
LGMF525	-22,3037	-47,0117	588,0	LGMF555	-22,3032	-47,0127	595,6
LGMF526	-22,3036	-47,0118	579,1	LGMF556	-22,3031	-47,0127	592,5
LGMF527	-22,3036	-47,0118	576,7	LGMF557	-22,3031	-47,0128	588,6
LGMF528	-22,3036	-47,0119	572,1	LGMF558	-22,3031	-47,0128	589,4
LGMF529	-22,3036	-47,0119	571,3	LGMF559	-22,3031	-47,0128	589,4
LGMF530	-22,3036	-47,0119	571,3	LGMF560	-22,3031	-47,0128	593,4

TABELA 2 – CÓDIGO DOS ISOLADOS E LOCALIZAÇÃO DAS PLANTAS PROVENIENTES DA FAZENDA CALIFÓRNIA EM BARRETOS – SP

Código do isolado	Localização da Planta			Código do isolado	Localização da Planta		
	Latitude	Longitude	Altitude(m)		Latitude	Longitude	Altitude(m)
LGMF561	-20,4134	-48,5874	513,4	LGMF591	-20,4128	-48,5858	541,0
LGMF562	-20,4123	-48,5850	471,1	LGMF592	-20,4128	-48,5858	541,0
LGMF563	-20,4124	-48,5853	479,9	LGMF593	-20,4129	-48,5860	511,4
LGMF564	-20,4124	-48,5854	490,4	LGMF594	-20,4129	-48,5860	510,0
LGMF565	-20,4123	-48,5851	479,9	LGMF595	-20,4129	-48,5860	510,0
LGMF566	-20,4123	-48,5850	508,5	LGMF596	-20,4130	-48,5860	513,2
LGMF567	-20,4123	-48,5849	544,1	LGMF597	-20,4130	-48,5861	516,5
LGMF568	-20,4124	-48,5850	528,2	LGMF598	-20,4130	-48,5861	516,5
LGMF569	-20,4124	-48,5850	516,1	LGMF599	-20,4130	-48,5861	516,5
LGMF570	-20,4124	-48,5850	517,5	LGMF600	-20,4130	-48,5861	516,5
LGMF571	-20,4125	-48,5851	529,9	LGMF601	-20,4131	-48,5862	535,0
LGMF572	-20,4125	-48,5851	518,3	LGMF602	-20,4131	-48,5862	535,9
LGMF573	-20,4125	-48,5851	523,4	LGMF603	-20,4130	-48,5863	532,8
LGMF574	-20,4125	-48,5852	523,1	LGMF604	-20,4130	-48,5863	532,8
LGMF575	-20,4125	-48,5852	530,5	LGMF605	-20,4131	-48,5864	519,9
LGMF576	-20,4125	-48,5852	529,7	LGMF606	-20,4131	-48,5864	520,4
LGMF577	-20,4125	-48,5852	529,7	LGMF607	-20,4131	-48,5866	513,6
LGMF578	-20,4125	-48,5852	529,7	LGMF608	-20,4132	-48,5866	520,3
LGMF579	-20,4126	-48,5854	524,8	LGMF609	-20,4132	-48,5866	520,3
LGMF580	-20,4127	-48,5855	508,6	LGMF610	-20,4131	-48,5867	523,4
LGMF581	-20,4127	-48,5855	521,2	LGMF611	-20,4132	-48,5866	515,3
LGMF582	-20,4127	-48,5856	515,5	LGMF612	-20,4133	-48,5867	516,6
LGMF583	-20,4127	-48,5856	518,1	LGMF613	-20,4133	-48,5867	515,2
LGMF584	-20,4127	-48,5856	518,1	LGMF614	-20,4133	-48,5867	513,1
LGMF585	-20,4127	-48,5856	518,1	LGMF615	-20,4133	-48,5868	521,5
LGMF586	-20,4128	-48,5857	516,2	LGMF616	-20,4133	-48,5868	527,6
LGMF587	-20,4128	-48,5857	515,5	LGMF617	-20,4133	-48,5868	527,6
LGMF588	-20,4128	-48,5857	515,5	LGMF618	-20,4134	-48,5868	536,4
LGMF589	-20,4128	-48,5858	542,4	LGMF619	-20,4134	-48,5868	536,4
LGMF590	-20,4128	-48,5858	541,0	LGMF620	-20,4134	-48,5869	511,3

A metodologia utilizada para o isolamento dos microrganismos endofíticos foi a descrita por Petrini (1991) com algumas modificações. Foi realizada a desinfestação da superfície do material, a fim de se eliminarem os microrganismos epifíticos. As folhas foram lavadas em água corrente abundante, enquanto foram levemente esfregadas com auxílio de uma esponja. Em seguida as folhas foram imersas em água destilada esterilizada por 1 minuto, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, por 4 minutos, novamente lavadas em etanol 70% por 30 segundos, e por último em água destilada esterilizada por 6 minutos.

As folhas foram cortadas em 2 fragmentos com cerca de 1cm² para folhas de citros e com cerca de 0,5cm² para folhas da vegetação espontânea. Todos os fragmentos foram obtidos utilizando um bisturi esterilizado, no interior de câmara de fluxo laminar. Cada fragmento foi retirado de um dos lados da nervura central e transferido para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Item 4.7.1.) pH 6,8 com tetraciclina 100 µg/mL para impedir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a temperatura de 22°C. Como controle, após o processo de desinfestação, foram plaqueados 0,1mL da última água destilada esterilizada, em três placas de Petri, as quais permaneceram incubadas nas mesmas condições do isolamento.

4.3 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

A preservação dos isolados foi realizada em meio inclinado em tubos de ensaio contendo 5ml de meio Ágar de Batata e Dextrose (Item 4.7.1.) pH 6,8 incubados a 22°C. Após crescimento micelial sobre toda a superfície do meio, os tubos foram armazenados em temperatura ambiente e as rolhas de vedação dos tubos de ensaio foram embebidas em solução de Benzoato de Benzila a fim de evitar a contaminação das colônias por ácaros. Sendo realizados repiques das colônias a cada dois meses.

4.4 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS

Após os isolados terem sido selecionados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, colônias monospóricas foram obtidas, cultivando os isolados endofíticos em placas de Petri com meio BDA (Item 4.7.1.) a 22°C. Observou-se o crescimento da colônia e monitorou-se com observação em microscopia óptica a produção de esporos. Estes foram coletados e imersos em solução salina a 0,85%. Em Câmara de Neubauer foram contados os esporos e a solução foi diluída até conter 10^3 esporos por mL. Foram semeados 100 µL de suspensão em uma placa de Petri contendo meio BDA, espalhou-se com alça de Drigalsky, incubou-se a 22°C.

Passadas 24 horas a este processo de semeadura de esporos, as placas foram analisadas sob microscópio estereoscópico e apenas um esporo foi selecionado e coletado em tubos com BDA (Item 4.7.1.) inclinado que após crescimento por sete dias a 22°C as rolhas de algodão dos tubos foram embebidas em solução de Benzoato de Benzila na câmara de fluxo e armazenados à temperatura ambiente. Novo repique foi realizado a cada dois meses.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

4.5.1 Caracterização Cultural

A caracterização cultural, baseou-se na determinação da velocidade de crescimento micelial e na observação de características morfológicas das colônias de cada isolado, quando cultivados em meio BDA (Item 4.7.1.). Neste experimento utilizaram-se os 120 isolados de folhas de citros, e para cada isolado, discos de micélios de 10mm de diâmetro foram obtidos das bordas de uma colônia cultivada por 7 dias em meio BDA Merck® (39g/L) e transferidos para o centro de novas placas de Petri contendo o mesmo meio. Após a repicagem, os isolados foram incubados a temperatura de 22°C na ausência de luz por um período de 7 dias.

A avaliação do experimento foi realizada nos dias 5, 6 e 7 de crescimento, através da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia com o auxílio de régua milimetrada. A velocidade média de crescimento micelial, expressa em mm/dia, foi utilizada para as análises estatísticas. Ao sétimo dia de cultivo, também foi observada a coloração de cada colônia.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa. Os dados correspondentes à velocidade de crescimento micelial dos isolados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do Teste Scott-Kott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional ASSISTAT versão 7.5 (SILVA; AZEVEDO, 2002; 2006).

4.5.2 Caracterização Morfológica

Neste experimento determinou-se o tamanho e formato dos conídios produzidos por cada isolado. As placas utilizadas para a caracterização cultural foram as mesmas para a caracterização morfológica, sendo retirados esporos no sétimo dia de crescimento. Para estudo das dimensões e formatos, 20 conídios de cada isolado em estudo foram avaliados em sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico. As mensurações das dimensões reais dos mesmos foram realizadas diretamente por meio do software ImageTool v.3 (WILCOX *et al.*, 2002).

Os valores médios de comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios de cada isolado foram utilizados para análise estatística. Nesta análise a parcela experimental foi representada por um conídio, sendo utilizado, portanto, 20 repetições por tratamento. Os resultados foram obtidos através do software ImageTool (WILCOX *et al.*, 2002), submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do programa computacional R (R Development Core Team, 2009) utilizando algoritmo Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (JELIHOVSCHI; FARIA; OLIVEIRA, 2009).

4.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.6.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados por 3 dias em placa de Petri contendo meio BDA (Item 4.7.1.) com celofane, sob temperatura de 22°C, no escuro. O micélio foi coletado e liofilizado por 24 horas e macerado com nitrogênio líquido.

Aproximadamente 100mg de micélio macerado foram colocados em tubo para microcentrífuga de 2 mL contendo 1,5 mL de tampão de extração (125mmol/L de Tris-HCl pH 8,0; 2 mol/L de cloreto de sódio; 50 mmol/L de EDTA pH8,0; 1% SDS pH7,2) seguidos por 5 minutos de agitação em vórtex. As amostras foram incubadas por 40 minutos em 55°C misturadas por inversão a cada 10 minutos, quando então foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 g; 1 mL do sobrenadante foi removido e transferido para outro tubo. O volume de 1 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado, agitado em vórtex por 2 minutos e centrifugado por 15 minutos a 5.000 x g. O volume de 0,6 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 0,9 mL de acetato de sódio (5 mol/L). As amostras foram agitadas em vórtex por 2 minutos e centrifugadas por 30 minutos a 13.000 x g. Finalmente, 1mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo, 1mL de isopropanol gelado foi adicionado e centrifugado a 12.000 g por 25 minutos a 4°C, o *pellet* com DNA permaneceu no tubo e o sobrenadante foi descartado. Procedeu-se com dupla lavagem do *pellet* com etanol 70% (500 µL, 5 minutos a 12.000 x g). Após secagem de 30 minutos a 37°C o *pellet* foi ressuspensionado em água Mili-Q por pelo menos 1 hora.

A concentração do DNA foi quantificada em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídio, comparando visualmente a intensidade das bandas formadas com um padrão de peso conhecido ("High DNA mass ladder - Invitrogen®). As amostras foram então diluídas até a concentração de 10 ng DNA/ µL de suspensão e armazenadas sob temperatura de -20°C.

Foram ainda utilizados DNA referência de *Colletotrichum gloeosporioides* (Col 11) e *Colletotrichum boninense* (Col 3) (PILEGGI *et al*, 2009).

4.6.2 Análise por PCR Espécie-Específica

Para identificação molecular pela técnica de PCR, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense*.

Para a identificação de *C. gloeosporioides* foi utilizado o oligonucleotídeo CgInt (5' – GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG- 3') descrito por Mills, Sreenivasprasad e Brown (1992) em conjunto com o ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') descrito por White e Morrow (1990) que possibilitam amplificação de fragmentos de 450 pb. Para a identificação de *C. acutatum* foi utilizado o oligonucleotídeo Calnt2 (5' – GGG GAA GCC TCT CGC GG - 3') (SREENIVASAPRASAD *et al*, 1996) em conjunto com o ITS4 amplificando fragmento de 490 pb. E para a identificação de *C. boninense* foi utilizado o oligonucleotídeo Col1 (5' – GCC GTC CCC TGA AAA G – 3') (PILEGGI *et al*, 2009) em conjunto com o ITS4 permitindo a amplificação de fragmento de 520 pb. Todos estes *primers* foram sintetizados a partir da região ITS1 do DNA ribossomal (FIGURA 4).

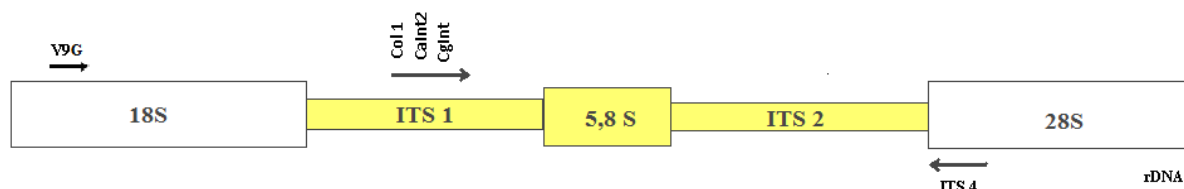


FIGURA 4 - REGIÃO DE HIBRIDIZAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO E PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA.

FONTE: o autor

A reação foi realizada com 25 µL de solução, em água MiliQ, contendo 2 µL de DNA extraído quantificados a concentração 10 – 100 ng/ mL, 2,5 µL de tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTP, 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos e 0,5 U Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® (Modelo: Mastercycler Gradient), com uma desnaturação inicial por um período de 5 minutos a 95°C, seguido por um ciclo de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C, 90 segundos a 72°C, um ciclo de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 90

segundos a 72°C, seguidos por 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C e 90 segundos a 72°C com uma extensão final por um período de 3 minutos a 72°C.

A reação de PCR com os oligonucleotídeos Col1 e ITS4 foi realizada com volume final de 20 µL e utilizando-se 2 mM de MgCl₂. As demais condições foram mantidas sem alteração. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® (Modelo: Mastercycler Gradient) com uma desnaturação inicial por um período de 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 65°C, 90 segundos a 72°C com uma extensão final por um período de 3 minutos a 72°C.

Após a amplificação, os produtos das PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE juntamente com 100 bp DNA ladder (Invitrogen®). A corrida eletroforética foi realizada a corrente constante de 3 volts/cm por 2 horas. As bandas de amplificação foram visualizadas com brometo de etídio em transiluminador ultravioleta e fotodocumentadas.

4.6.3 Análise por Sequenciamento da Região ITS1-5,8s-ITS2 do rDNA

4.6.3.1 Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA

A reação foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA - 3') (DE HOOG *et al.*, 2003) e ITS4 os quais permitem amplificar a região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal, como mostra a figura 4.

Para esta amplificação foi realizada reação de PCR com um volume total de 12,5 µL solução, em água Mili-Q contendo 1,25 µL de tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTP, 3 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 10 – 100 ng/mL de DNA extraído e 1,25 U de Taq DNA polimerase (todos os reagentes da Invitrogen®). A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® (Modelo: Mastercycler Gradient), com desnaturação inicial

a 94° C por 5 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 50 segundos a 55° C, 2 minutos a 72° C; seguida de extensão final de 5 minutos a 72° C.

4.6.3.2 Purificação da reação de PCR

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% (p/v) e purificados com Sephadex[™] G-50 *Fine DNA Grade*. Após purificação, os produtos da PCR foram quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen[®]).

4.6.3.3 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento da região ITS1 - 5,8S - ITS2 do rDNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger; Nicklen e Coulson (1977), utilizando a incorporação de dideoxinucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático de DNA.

Para reação foram utilizadas de 50 a 100 ng do produto de PCR purificado, 0,25 µM do *primer*, 2 µl da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da Amersham Biosciences[®]) e água ultrapura quando necessária para completar um volume final de 10 µl.

As mesmas condições foram aplicadas para os *primer* V9G e ITS4. A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf[®] (Modelo: Mastercycler Gradient), seguindo uma desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 1 minutos a 60° C.

As reações de sequenciamento foram purificadas com Sephadex[™] G-50 *Fine DNA Grade*, e submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences[®]).

4.6.3.4 Edição e Análise das Sequências

A edição e o alinhamento das sequências obtidas foi realizado com auxílio dos programas BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 2001) e MEGA 4.1 (KUMAR *et al.*, 2008). As sequências obtidas foram também comparadas com outras sequências existentes no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), o qual permite detectar homologia de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes.

4.6.3.5 Análise Filogenética.

Após a edição, alinhamento e análise prévia das sequências, estas foram submetidas aos softwares MEGA 4.1 e PAUP (SWOFFORD, 2002) para obtenção das árvores filogenéticas baseadas em distância. A consistência dos nós obtidos foi avaliada pelo procedimento de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 reamostragens.

Foram utilizadas como referência linhagens de *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. boninensis* e fungo endofítico depositadas no GenBank.

4.7 MEIOS DE CULTURA

4.7.1 Meio BDA (Meio Ágar-Batata-Dextrose)

Batata	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	p/1000 mL

As batatas foram descascadas e em pequenos pedaços cozidas em meio litro de água destilada por 15 minutos. O caldo resultante, após ser filtrado e seu volume completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado para 6,8 quando então foi adicionado ágar, e autoclavado a 1 atmosfera (atm) por 20 minutos.

4.8 SOLUÇÕES E REAGENTES

4.8.1 Tampão de Corrida TBE 10X

Trizma base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA	4,65 g
Água Milli-Q	p/ 500 mL

A solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente. No momento do uso, diluiu-se 10 vezes com água Milli-Q.

4.8.2 Gel De Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TBE 1x	100 mL

4.8.3 Gel De Agarose (1,0%)

Agarose	1,0 g
Tampão TBE 1x	100 mL

4.8.4 Gel de Agarose (1,5%)

Agarose	1,5 g
Tampão TBE 1x	100 mL

4.8.5 Solução de Brometo de Etídeo

De acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada. A solução foi então estocada à temperatura ambiente. Para revelação, foram diluídos 3 μ L em 100 mL de água destilada

4.8.6 Tampão da Amostra (6X)

Azul de bromofenol	250 mg
Ficoll	15 g
Água	100 mL

4.8.7 Solução de Benzoato de Benzila.

Benzoato de Benzila	200 mL
Etanol	600 mL
Eosina	100 mg

A solução foi preparada em câmara de fluxo, manipulada com luvas e mantida bem fechada à temperatura ambiente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO

Nos 2 isolamentos de fungos endofíticos de folhas de citros foram analisadas 60 plantas de duas regiões do Estado de São Paulo. Sendo obtidos 189 isolados de *Colletotrichum* da região de Mogi-Guaçu e 197 isolados da região de Barretos. Deste total foi selecionado 1 isolado de *Colletotrichum* proveniente de cada planta para as análises posteriores, somando assim, 120 isolados das duas regiões.

Nos 4 isolamentos de fungos endofíticos das plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos de São Paulo, foram obtidos 43 isolados de 15 tipos de plantas, como mostra a tabela 3.

TABELA 3 – CÓDIGO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA EM POMARES CÍTRICOS DE RINCÃO/SP

Código dos isolados	Nome popular/ Nome Científico das plantas	Isolamento
LGMF621	Capim Coloninho (<i>Echinochloa colonum</i>)	I
LGMF622	Bosta de Banana (Tibet, Carrapicho)	I
LGMF623	Carrapicho Arroz Bugre (<i>Amaranthus deflexus</i>)	II
LGMF624	Guanxuma (<i>Sida rhombifolia</i>)	II
LGMF625	Guanxuma (<i>Sida rhombifolia</i>)	II
LGMF626	Carrapicho Arroz Bugre (<i>Amaranthus deflexus</i>)	II
LGMF627	Falsa Serralha (<i>Emilia sonchifolia</i>)	II
LGMF628	Picão-Preto (<i>Bidens pilosa</i>)	II
LGMF629	Brachiaria (<i>Brachiaria sp</i>)	II
LGMF630	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	III
LGMF631	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	III
LGMF632	Carrapicho Arroz Bugre (<i>Amaranthus deflexus</i>)	III
LGMF633	Carrapicho Arroz Bugre (<i>Amaranthus deflexus</i>)	III
LGMF634	Carrapicho Arroz Bugre (<i>Amaranthus deflexus</i>)	III
LGMF635	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	III
LGMF636	Vassoura (<i>Sida sp</i>)	III
LGMF637	Vassoura (<i>Sida sp</i>)	III
LGMF638	Brachiária (<i>Brachiaria sp</i>)	III
LGMF639	Pé-de-Galinha (<i>Eleusine indica</i>)	III

TABELA 3 – CÓDIGO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA EM POMARES CÍTRICOS DE RINCÃO/SP (CONCLUSÃO)

Código dos isolados	Nome popular/ Nome Científico das plantas	Isolamento
LGMF640	Pé-de-Galinha(<i>Eleusine indica</i>)	III
LGMF641	Capim Coloninho (<i>Echinochloa colonum</i>)	IV
LGMF642	Erva de Santa Luzia (<i>Chamaesyce hirta</i>)	IV
LGMF643	Erva de Santa Luzia (<i>Chamaesyce hirta</i>)	IV
LGMF644	Falsa Serralha (<i>Emilia sonchifolia</i>),	IV
LGMF645	Buva (<i>Conyza bonariensis</i>)	IV
LGMF646	Buva (<i>Conyza bonariensis</i>)	IV
LGMF647	Buva (<i>Conyza bonariensis</i>)	IV
LGMF648	Buva (<i>Conyza bonariensis</i>)	IV
LGMF649	Picão-Preto (<i>Bidens pilosa</i>)	IV
LGMF650	Capim Sempre verde(<i>Panicum maximum</i> variedade <i>Gongyloides</i> var.)	IV
LGMF651	Capim Sempre verde(<i>Panicum maximum</i> variedade <i>Gongyloides</i> var.)	IV
LGMF652	Carrapicho Arroz Bugre (<i>Amaranthus deflexus</i>)	IV
LGMF653	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	IV
LGMF654	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	IV
LGMF655	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	IV
LGMF656	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	IV
LGMF657	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	IV
LGMF658	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)	IV
LGMF659	Guanxuma (<i>Sida rhombifolia</i>)	IV
LGMF660	Guanxuma (<i>Sida rhombifolia</i>)	IV
LGMF661	Guanxuma (<i>Sida rhombifolia</i>)	IV
LGMF662	Beldroega (<i>Portulaca oleracea</i>)	IV
LGMF663	Beldroega (<i>Portulaca oleracea</i>)	IV

FONTE: o autor

5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Todos os 120 isolados endofíticos de folhas de citros e os 43 de plantas da vegetação espontânea foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. A coloração das colônias destes isolados apresentaram variação de cinza a laranja (FIGURAS 5, 6 e 7). O diâmetro da colônia e a velocidade de

crescimento micelial revelaram diferenças significativas entre os isolados em nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott, quando se comparou o crescimento micelial dos 3 dias analisados (TABELA 4). Os valores médios de crescimento colonial foram de 4,9cm (dia 5), 6,1cm (dia 6) e 6,8cm (dia 7). Pileggi *et al.* (2009) usando diâmetro das colônias após o sexto dia de crescimento em BDA (Merck®) a 22°C pode discriminar isolados de *C. gloeosporioides* e *C. boninense*. Usando este mesmo critério, os isolados foram agrupados em 5 grupos diferentes, porém não foi possível separar em espécies (TABELAS 4). Utilizando-se a velocidade de crescimento da colônia dos dias 5, 6 e 7, também diferentes agrupamentos foram obtidos não sendo possível separar os isolados em mesmos grupos e identificá-los em nível de espécie (TABELA 4).

Igualmente, diferentes agrupamentos foram observados quando os critérios analisados foram comprimento e largura dos conídios (FIGURA 8) (TABELA 4).

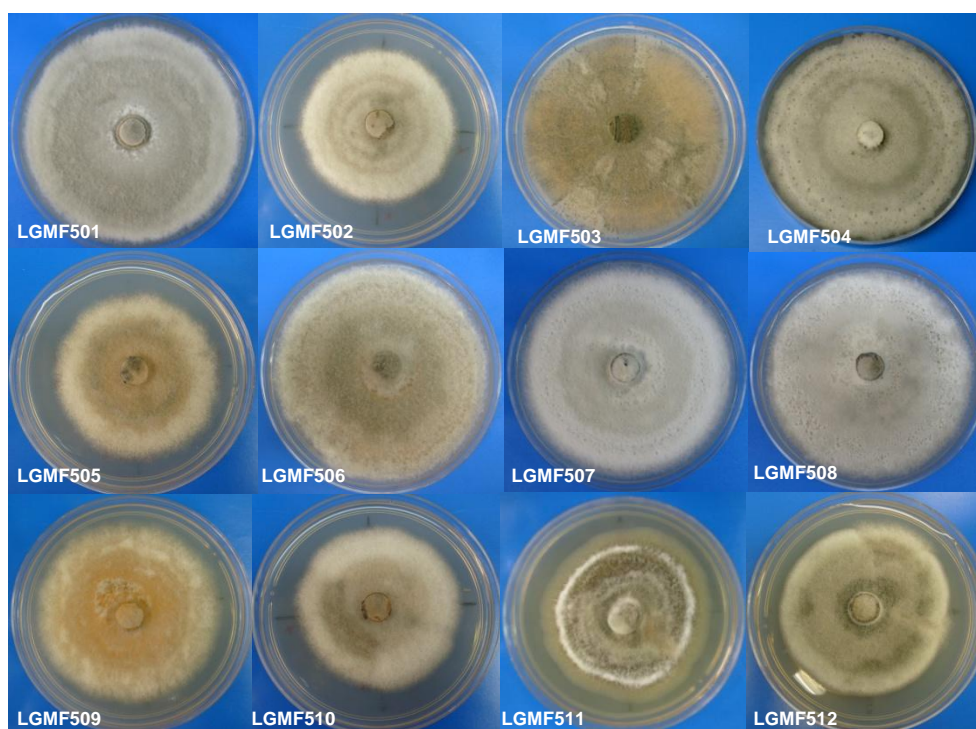


FIGURA 5 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES DE MOGI-GUAÇU/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUA)

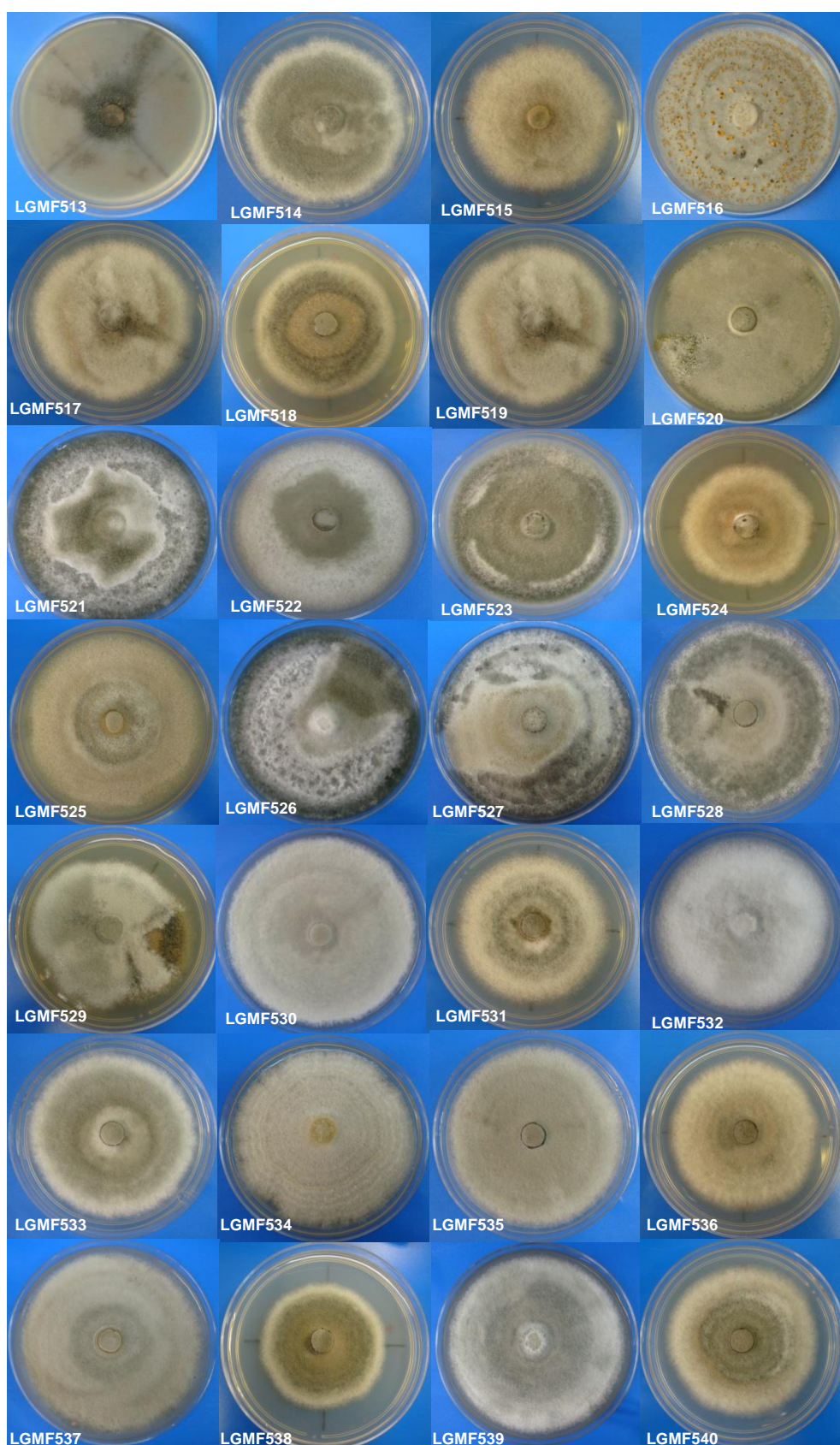


FIGURA 5 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES DE MOGI-GUAÇU/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUAÇÃO)

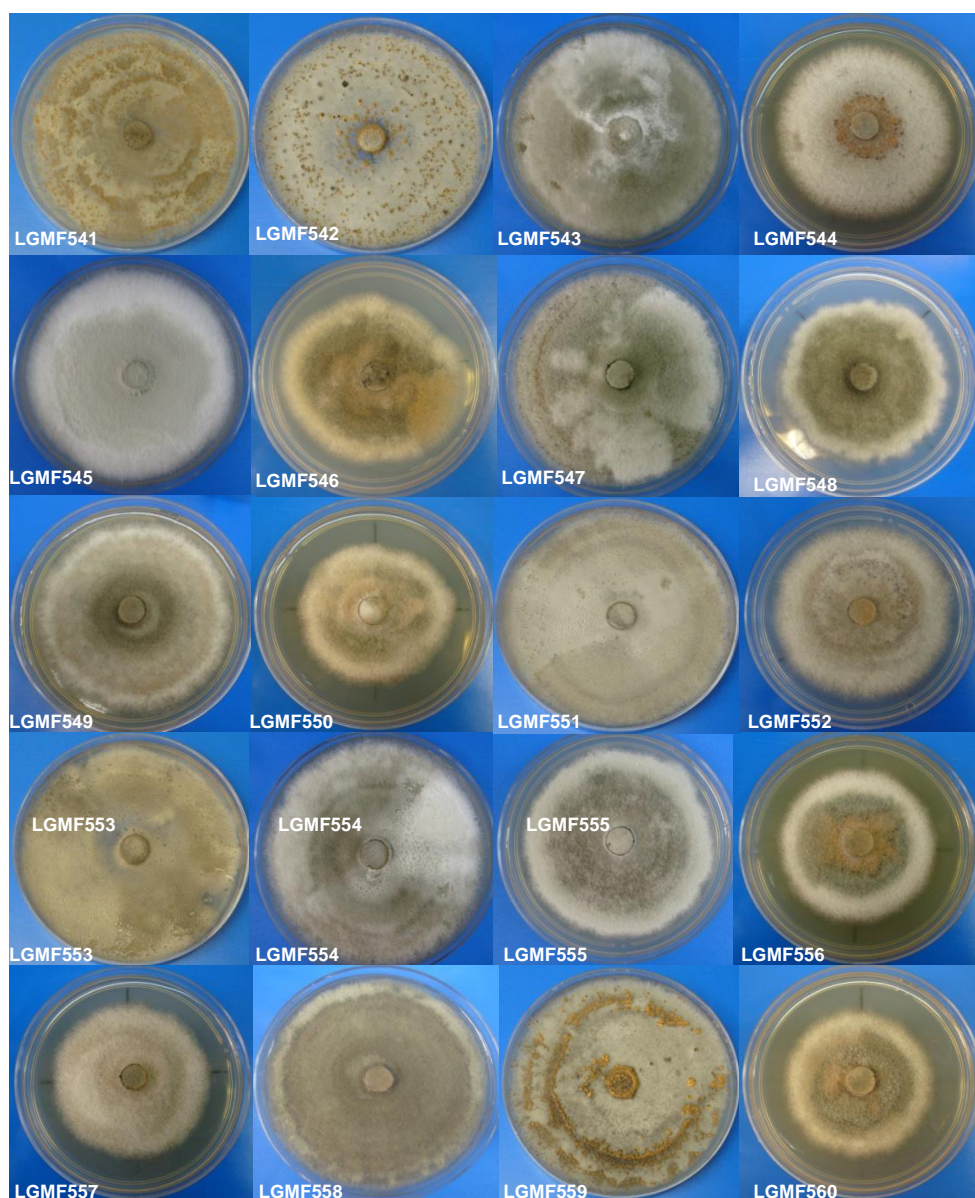


FIGURA 5 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES DE MOGI-GUAÇU/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONCLUSÃO)

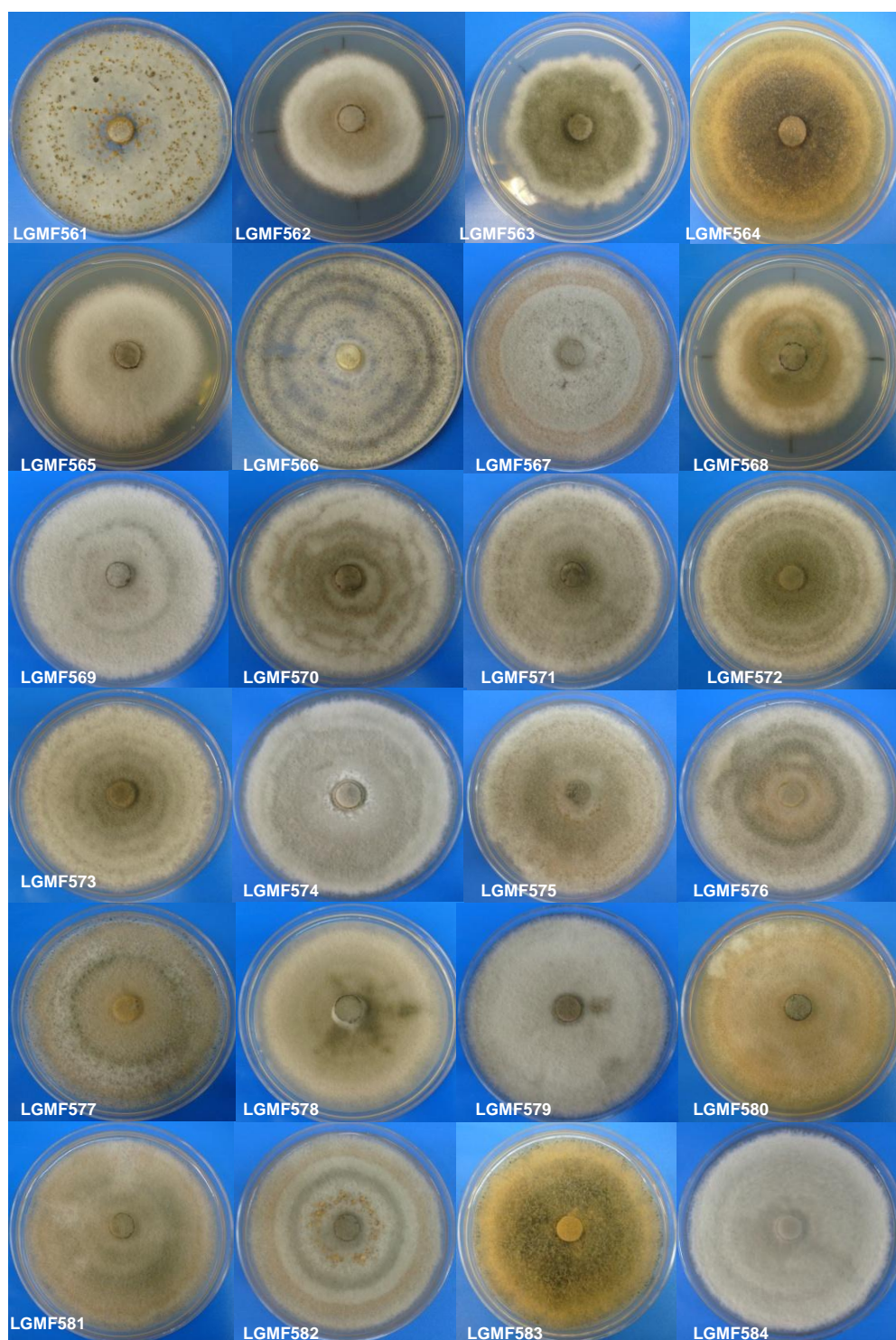


FIGURA 6 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES DE BARRETOS/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUA)

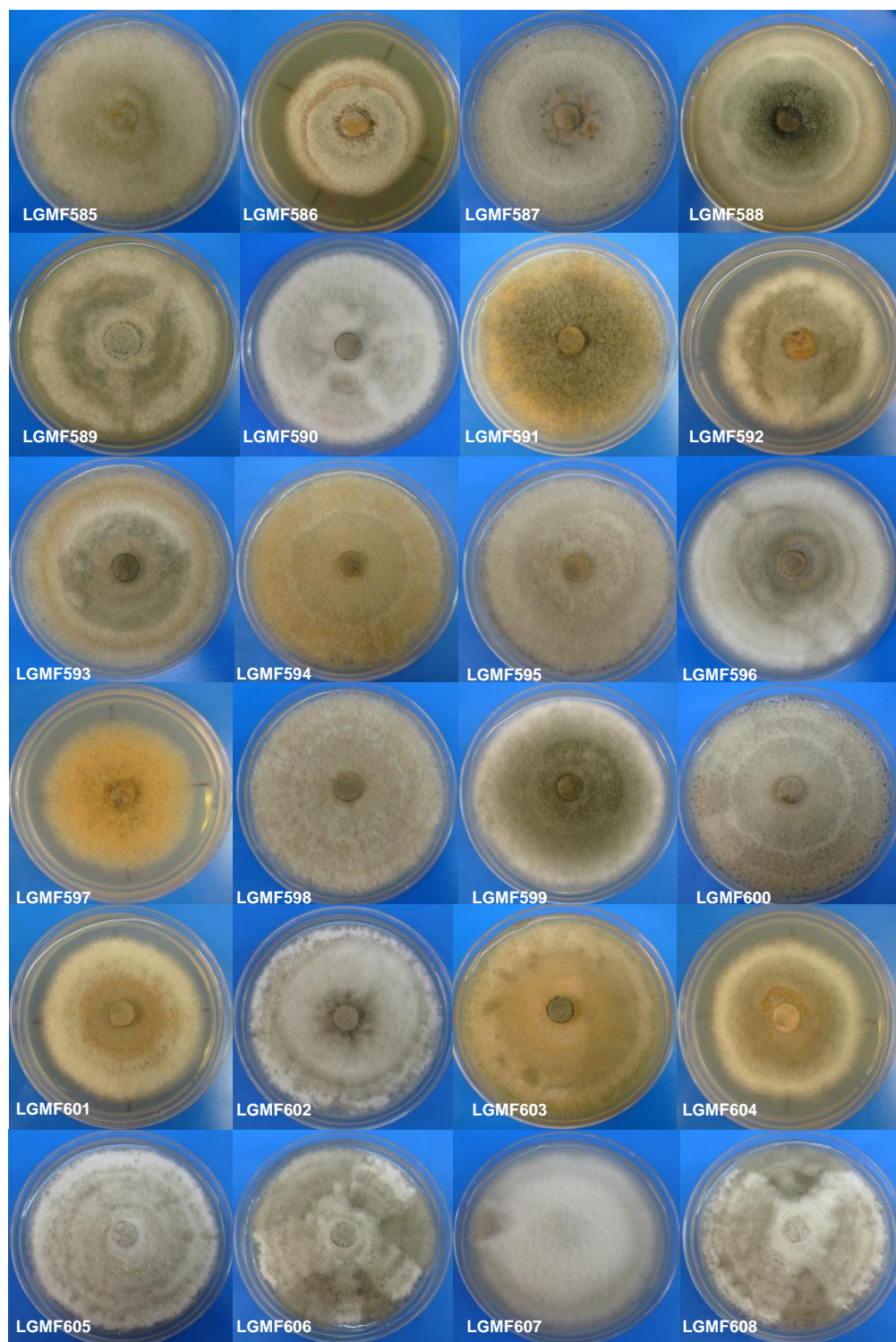


FIGURA 6 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES de BARRETOS/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUAÇÃO)

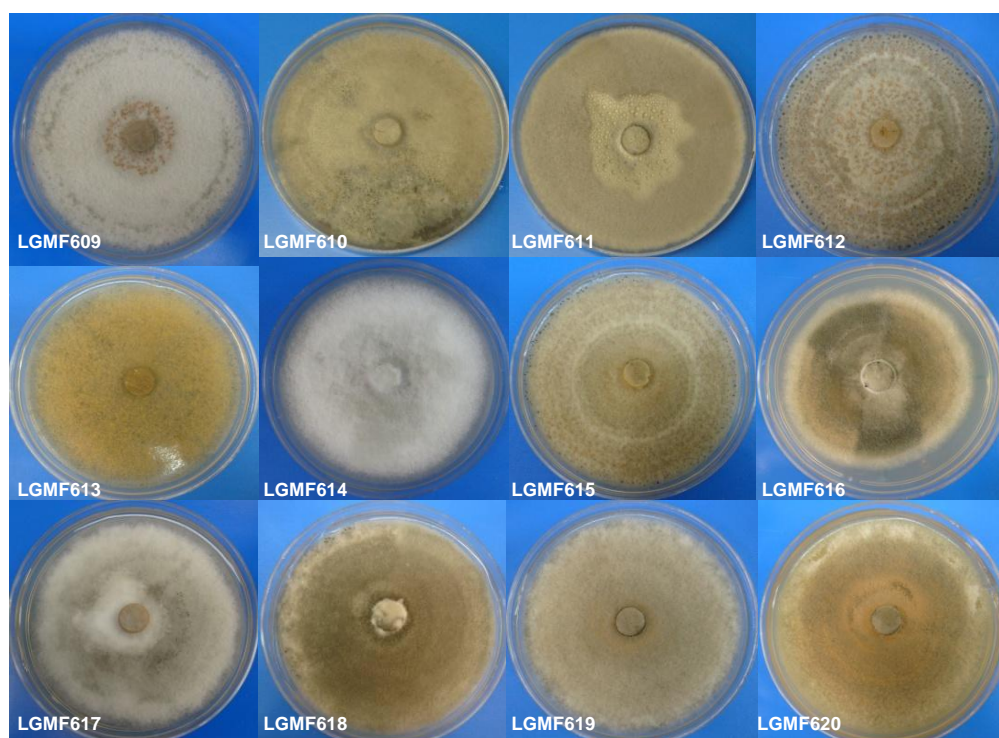


FIGURA 6 – MACROMORFOLOGIA DAS 60 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS CÍTRICAS PROVENIENTES DE BARRETOS/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONCLUSÃO)

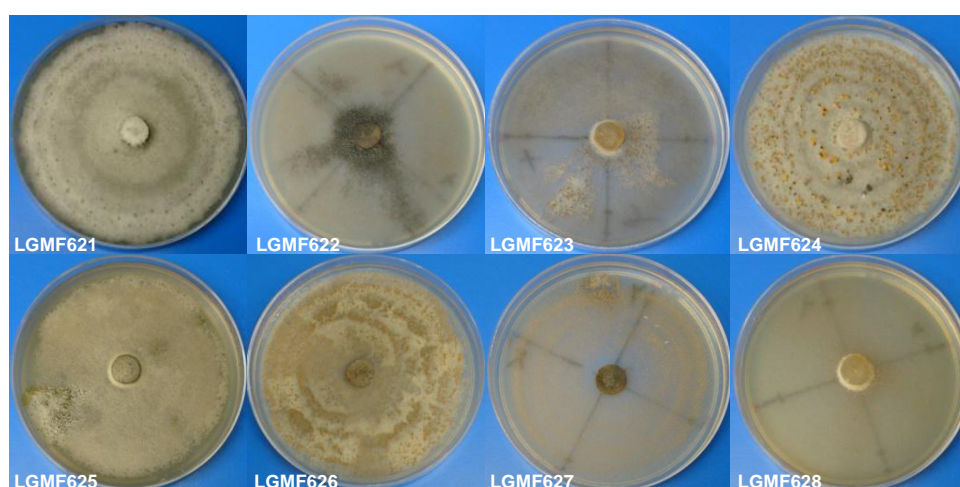


FIGURA 7 – MACROMORFOLOGIA DAS 43 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA DE RINCÃO/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUA)

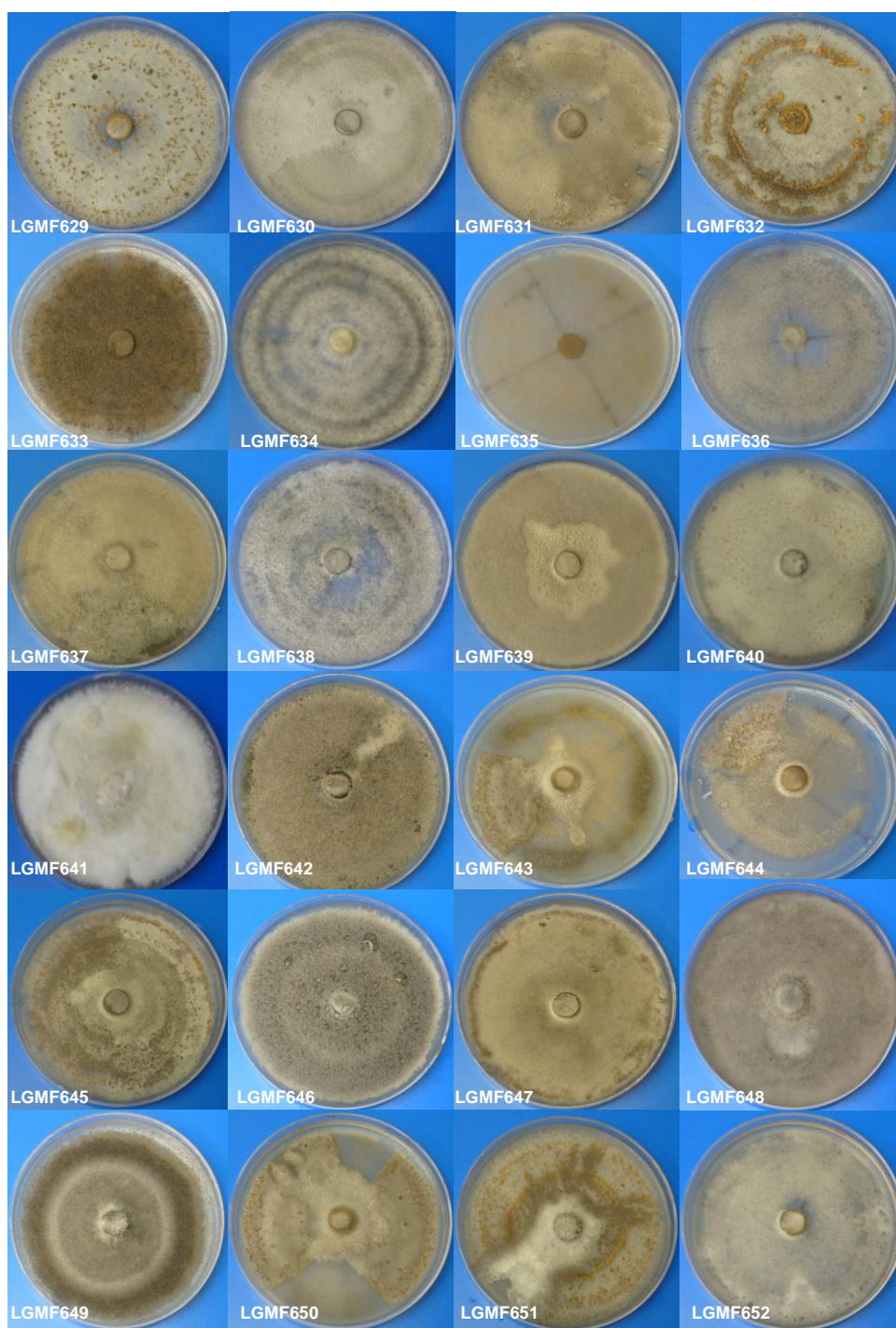


FIGURA 7 – MACROMORFOLOGIA DAS 43 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA DE RINCÃO/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUAÇÃO)

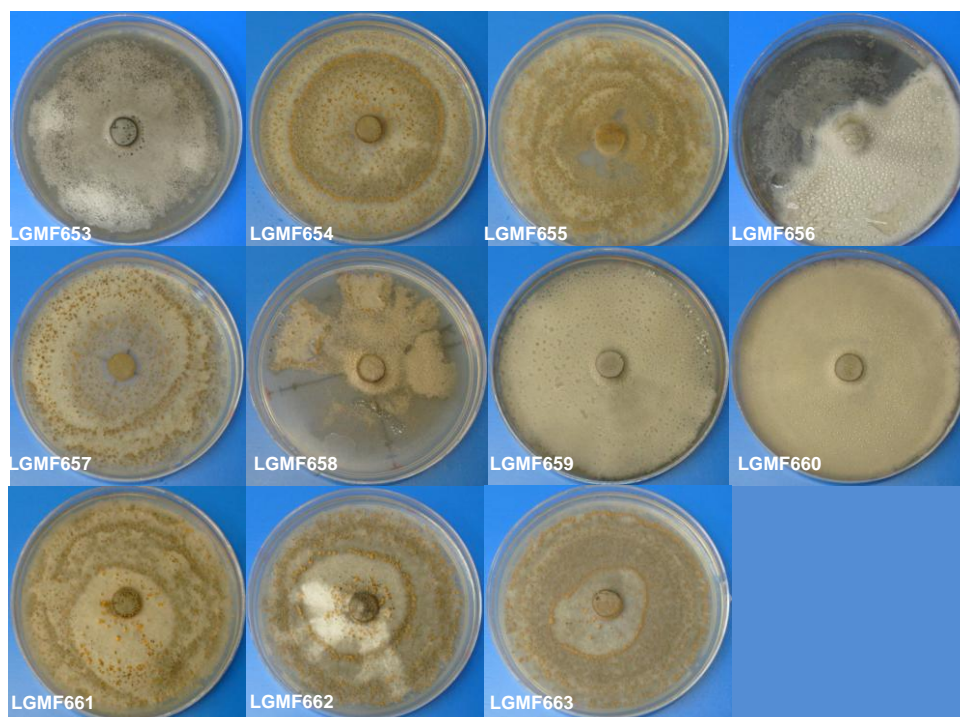


FIGURA 7 – MACROMORFOLOGIA DAS 43 COLÔNIAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA DE RINCÃO/SP, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONCLUSÃO)

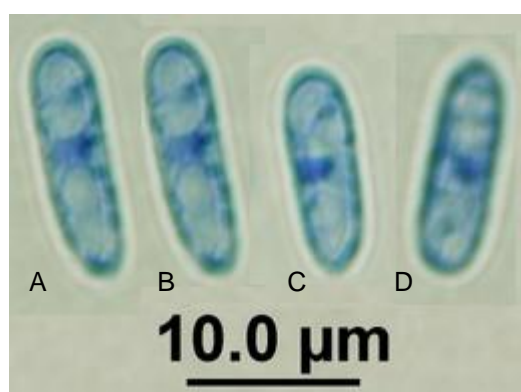


FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA DE CONÍDIOS DE 4 ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* PROVENIENTES DE PLANTAS CÍTRICAS (A,B) E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA (C,D).

Nota: Coloração com Lactofenol azul de algodão

TABELA 4 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO, DIÂMETRO COLONIAL E TAMANHO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICOS DE PLANTAS CÍTRICAS E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA, APÓS 5, 6 E 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUA)

Código dos Isolados	Velocidade de crescimento mm/dia		Diâmetro da colônia a 22°C (mm)						Comprimento do conídio (µm)		Largura do conídio(µm)	
			Dia 5		Dia 6		Dia 7					
LGMF561	a	0,755	537	b	618	b	688	c	12,8780	b	3,8185	c
LGMF506	a	0,800	452	d	540	c	612	e	12,6175	c	4,0740	b
LGMF550	a	0,810	391	f	470	d	553	f	13,8320	a	3,8980	c
LGMF539	a	0,780	382	f	458	d	538	g	11,5140	e	4,2300	b
LGMF534	a	0,740	354	g	442	d	502	g	13,7320	a	3,7270	d
LGMF566	b	0,855	613	a	721	a	784	a	12,481	c	4,0195	b
LGMF630	b	0,860	551	d	683	c	775	c	12,4805	c	3,9580	d
LGMF643	b	0,725	589	c	683	c	767	c	12,0340	c	4,2420	c
LGMF524	b	0,900	440	d	542	c	620	d	12,7210	c	3,8260	c
LGMF508	b	0,865	444	d	537	c	617	d	11,0570	f	3,5415	e
LGMF513	b	0,910	411	e	504	c	593	e	12,0300	d	3,9555	b
LGMF556	b	0,900	412	e	503	c	592	e	13,0320	b	4,3815	a
LGMF533	b	0,880	403	e	487	d	579	e	12,6370	c	4,1160	b
LGMF541	b	0,870	392	f	477	d	566	f	13,9975	a	4,0065	b
LGMF538	b	0,840	388	f	475	d	556	f	13,0095	b	4,2685	a
LGMF560	b	0,895	389	f	470	d	568	f	12,5210	c	3,9940	b
LGMF501	b	0,880	379	f	458	d	555	f	12,9200	b	3,8800	c
LGMF512	b	0,835	352	g	438	d	519	g	13,0430	b	4,3325	a
LGMF553	c	1,000	589	a	703	a	789	a	11,7640	d	4,1430	b
LGMF575	c	0,900	623	a	698	a	803	a	13,9910	a	4,2165	b
LGMF551	c	1,015	564	a	689	a	767	b	11,7970	d	4,0905	b
LGMF542	c	0,995	572	a	680	a	771	b	14,2140	a	3,9090	c
LGMF608	c	1,010	538	b	679	a	740	b	12,7070	c	3,9785	b
LGMF516	c	1,085	550	b	673	a	767	b	12,4395	c	3,9910	b
LGMF537	c	0,995	545	b	666	a	744	b	12,8240	b	3,7700	c
LGMF567	c	0,955	545	b	657	b	736	b	12,2320	c	3,9610	b
LGMF526	c	0,990	540	b	645	b	738	b	12,0055	d	3,8595	c
LGMF563	c	0,995	542	b	640	b	741	b	11,6995	d	4,3030	a
LGMF618	c	0,970	514	c	638	b	708	c	12,586	c	3,8815	c
LGMF599	c	0,975	508	c	635	b	703	c	13,5795	a	4,1180	b
LGMF628	c	0,905	702	a	775	a	834	a	11,0570	d	3,5415	e
LGMF654	c	0,915	637	b	758	a	829	a	13,7320	a	3,7270	e
LGMF660	c	0,835	629	c	755	a	809	b	12,3785	c	4,1445	c
LGMF621	c	0,800	651	b	753	a	832	a	12,9200	b	3,8800	d
LGMF644	c	0,899	645	b	748	a	807	b	12,7210	b	3,8260	d

TABELA 4 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO, DIÂMETRO COLONIAL E TAMANHO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICOS DE PLANTAS CÍTRICAS E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA APÓS 5, 6 E 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUAÇÃO)

Código dos Isolados	Velocidade de crescimento mm/dia		Diâmetro da colônia a 22°C (mm)						Comprimento do conídio (µm)		Largura do conídio(µm)	
			Dia 5		Dia 6		Dia 7					
LGMF637	c	0,905	617	c	709	b	793	b	12,6055	b	3,8950	d
LGMF629	c	0,830	572	d	694	c	787	b	13,4330	a	3,9745	d
LGMF659	c	0,910	552	d	689	c	768	c	11,5140	d	4,2300	c
LGMF661	c	0,810	552	d	648	d	733	d	13,9975	a	4,0065	d
LGMF657	c	0,890	506	e	647	d	748	d	12,8240	b	3,7700	e
LGMF652	c	0,985	501	e	609	d	712	d	12,9070	b	3,8335	d
LGMF602	c	0,970	506	c	630	b	700	c	13,5610	a	4,0350	b
LGMF605	c	0,995	494	c	630	b	693	c	13,0295	b	4,2555	a
LGMF520	c	1,000	500	c	626	b	700	c	12,1035	d	4,2640	a
LGMF589	c	0,995	484	c	609	b	683	c	12,8665	b	3,8280	c
LGMF592	c	0,960	496	c	597	b	688	c	13,5990	a	4,0040	b
LGMF548	c	0,990	484	c	594	b	682	c	13,5115	a	3,7665	c
LGMF590	c	1,020	417	e	526	c	621	d	13,2180	b	4,4685	a
LGMF554	c	0,935	431	d	522	c	618	d	11,4310	e	3,9270	c
LGMF617	c	0,930	425	e	521	c	611	e	12,3700	c	3,9950	b
LGMF502	c	0,99	416	e	520	c	614	e	12,4450	c	3,9340	c
LGMF544	c	1,000	410	e	504	c	610	e	13,3335	b	4,6240	a
LGMF507	c	0,965	409	e	500	c	602	e	11,8585	d	3,9635	b
LGMF514	c	0,945	403	e	500	c	592	e	12,7060	c	4,2290	b
LGMF529	c	0,935	389	f	489	d	576	e	12,7015	c	4,6675	a
LGMF555	c	0,945	391	f	488	d	580	e	12,6115	c	4,7480	a
LGMF549	c	1,010	385	f	484	d	587	e	12,1920	c	4,0545	b
LGMF510	c	0,990	381	f	478	d	579	e	12,4805	c	3,9580	b
LGMF543	c	0,985	373	f	467	d	570	f	12,4130	c	4,1590	b
LGMF547	c	0,950	345	g	438	d	535	g	13,1185	b	4,2810	a
LGMF616	c	0,955	339	g	434	d	530	g	13,6635	a	4,0260	b
LGMF511	c	0,930	254	h	353	e	440	h	12,7310	c	4,6665	a
LGMF610	d	1,085	574	a	714	a	791	a	12,4690	c	4,2350	b
LGMF584	d	1,025	585	a	713	a	790	a	12,0955	d	3,7110	d
LGMF593	d	1,105	542	b	704	a	763	b	12,5160	c	4,2160	b
LGMF603	d	1,100	530	b	685	a	750	b	13,2840	b	3,8055	c
LGMF591	d	1,045	546	b	684	a	755	b	12,5985	c	3,8775	c
LGMF594	d	1,105	535	b	684	a	756	b	13,6360	a	4,2545	b
LGMF595	d	1,070	542	b	684	a	756	b	13,1835	b	3,7705	c
LGMF569	d	1,085	544	b	680	a	761	b	12,5330	c	3,9345	c

TABELA 4 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO, DIÂMETRO COLONIAL E TAMANHO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICOS DE PLANTAS CÍTRICAS E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA APÓS 5, 6 E 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUAÇÃO)

Código dos Isolados	Velocidade de crescimento mm/dia		Diâmetro da colônia a 22°C (mm)						Comprimento do conídio (µm)		Largura do conídio(µm)	
			Dia 5		Dia 6		Dia 7					
LGMF596	d	1,100	539	b	677	a	759	b	13,2765	b	4,4035	a
LGMF559	d	1,055	550	b	669	a	761	b	13,8495	a	3,6840	d
LGMF574	d	1,025	519	c	649	b	724	c	12,4030	c	4,2540	b
LGMF576	d	1,025	519	c	649	b	724	c	13,1130	b	3,7920	c
LGMF611	d	1,055	545	b	649	b	756	b	13,7735	a	4,2355	b
LGMF607	d	1,100	516	c	648	b	736	b	13,2190	b	4,2865	a
LGMF627	d	0,980	679	a	778	a	845	a	11,8585	c	3,9635	d
LGMF651	d	0,985	61	c	762	a	808	b	13,8330	a	3,9790	d
LGMF632	d	1,045	612	c	758	a	84	a	13,0430	b	4,3325	c
LGMF622	d	1,015	629	c	746	a	838	a	12,4450	c	3,9340	d
LGMF634	d	0,975	639	b	745	a	821	a	12,7060	b	4,2290	c
LGMF653	d	1,045	602	c	722	b	798	b	12,6370	b	4,1160	c
LGMF656	d	0,955	561	d	706	b	791	b	12,0445	c	4,0520	c
LGMF645	d	1,015	603	c	705	b	77	c	11,5710	d	3,9300	d
LGMF647	d	1,040	598	c	702	b	806	b	12,0485	c	4,0600	c
LGMF642	d	1,015	615	c	699	b	76	c	12,7075	b	4,1515	c
LGMF639	d	0,990	574	d	678	c	783	c	11,9265	c	3,9705	d
LGMF624	d	0,975	584	d	673	c	744	d	11,9865	c	3,8900	d
LGMF640	d	0,995	568	d	672	c	771	c	12,1035	c	4,2640	c
LGMF633	d	1,025	577	d	669	c	776	c	12,0300	c	3,9555	d
LGMF623	d	1,005	560	d	656	d	777	c	11,9865	c	3,8900	d
LGMF649	d	1,030	524	e	636	d	738	d	12,7015	b	4,6675	b
LGMF662	d	1,055	519	e	631	d	725	d	14,2140	a	3,9090	d
LGMF663	d	0,960	51	e	627	d	715	d	12,4130	c	4,1590	c
LGMF528	d	1,050	544	b	644	b	754	b	10,7150	f	5,1615	a
LGMF570	d	1,110	491	c	642	b	713	c	12,9400	b	3,9295	c
LGMF517	d	1,070	484	c	636	b	698	c	12,6055	c	3,8950	c
LGMF564	d	1,045	499	c	628	b	708	c	12,5985	c	4,3425	a
LGMF535	d	1,090	498	c	627	b	716	c	12,9310	b	4,5845	a
LGMF578	d	1,105	478	c	612	b	699	c	12,4005	c	3,9380	c
LGMF620	d	1,030	447	d	582	b	653	d	12,5310	c	3,9945	b
LGMF523	d	1,090	448	d	558	c	666	c	12,0340	d	4,2420	b
LGMF601	d	1,070	439	d	549	c	653	d	12,5985	c	4,3425	a
LGMF568	d	1,035	426	e	539	c	633	d	13,6880	a	3,7505	c
LGMF530	d	1,070	407	e	537	c	621	d	11,8680	d	3,9500	c

TABELA 4 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO, DIÂMETRO COLONIAL E TAMANHO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICOS DE PLANTAS CÍTRICAS E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA APÓS 5, 6 E 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONTINUAÇÃO)

Código dos Isolados	Velocidade de crescimento mm/dia		Diâmetro da colônia a 22°C (mm)						Comprimento do conídio (µm)		Largura do conídio(µm)	
			Dia 5		Dia 6		Dia 7					
LGMF557	d	1,080	427	e	533	c	643	d	12,4430	c	3,9800	b
LGMF588	d	1,030	435	d	533	c	641	d	13,2245	b	4,3185	a
LGMF604	d	1,025	424	e	531	c	629	d	12,9045	b	4,1430	b
LGMF545	d	1,085	418	e	530	c	635	d	12,0640	d	3,8415	c
LGMF532	d	1,075	426	e	528	c	641	d	12,9070	b	3,8335	c
LGMF597	d	1,085	409	e	520	c	626	d	12,2890	c	4,4460	a
LGMF540	d	1,030	411	e	513	c	617	d	12,3785	c	4,1445	b
LGMF546	d	1,085	402	e	506	c	619	d	12,2945	c	3,9035	c
LGMF518	d	1,030	390	f	495	d	596	e	12,2865	c	3,9395	c
LGMF565	d	1,075	387	f	486	d	602	e	13,9015	a	4,0835	b
LGMF586	d	1,085	386	f	483	d	603	e	12,9675	b	4,2695	a
LGMF562	d	1,050	371	f	468	d	581	e	13,3100	b	4,6900	a
LGMF579	e	1,145	601	a	749	a	830	a	12,7235	c	3,8775	c
LGMF552	e	1,175	567	a	742	a	793	a	13,2720	b	3,8050	c
LGMF587	e	1,190	584	a	739	a	822	a	13,2245	b	4,3185	a
LGMF619	e	1,115	586	a	72	a	809	a	13,3675	b	3,8205	c
LGMF600	e	1,085	540	b	717	a	784	a	12,0495	d	4,2710	a
LGMF606	e	1,145	567	a	715	a	796	a	13,4220	a	4,0220	b
LGMF577	e	1,115	544	b	706	a	767	b	13,1130	b	3,7920	c
LGMF625	e	1,085	647	b	769	a	85	a	12,4225	c	4,2305	c
LGMF636	e	1,080	665	b	759	a	848	a	12,4395	c	3,9910	d
LGMF641	e	1,090	655	b	753	a	85	a	12,9905	b	4,0105	d
LGMF626	e	1,120	607	c	738	a	808	b	12,6175	b	4,0740	c
LGMF638	e	1,140	616	c	737	a	846	a	12,2865	c	3,9395	d
LGMF650	e	1,210	581	d	729	b	799	b	11,8680	c	3,9500	d
LGMF658	e	1,070	581	d	727	b	801	b	13,0095	b	4,2685	c
LGMF635	e	1,100	605	c	724	b	808	b	12,3860	c	4,0905	c
LGMF655	e	1,075	593	c	704	b	79	b	12,9310	b	4,5845	b
LGMF631	e	1,075	596	c	701	b	791	b	12,7310	b	4,6665	b
LGMF648	e	1,115	543	d	637	d	734	d	10,7150	d	5,1615	a
LGMF646	e	1,150	522	e	622	d	737	d	12,0055	c	3,8595	d
LGMF609	e	1,145	544	b	704	a	773	b	13,4565	a	3,9450	c
LGMF527	e	1,120	548	b	701	a	772	b	12,0485	d	4,0600	b
LGMF503	e	1,175	538	b	699	a	773	b	11,9865	d	3,8900	c
LGMF583	e	1,130	531	b	683	a	757	b	11,9315	d	3,7225	d
LGMF598	e	1,190	535	b	682	a	773	b	12,0885	d	4,3335	a

TABELA 4 – VELOCIDADE DE CRESCIMENTO, DIÂMETRO COLONIAL E TAMANHO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* ENDOFÍTICOS DE PLANTAS CÍTRICAS E DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA APÓS 5, 6 E 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C EM MEIO BDA (CONCLUSÃO)

Código dos Isolados	Velocidade de crescimento mm/dia		Diâmetro da colônia a 22°C (mm)						Comprimento do conídio (µm)		Largura do conídio(µm)	
			Dia 5		Dia 6		Dia 7					
LGMF582	e	1,190	507	c	670	a	745	b	11,9985	d	3,7600	c
LGMF571	e	1,295	493	c	665	a	752	b	12,621	c	3,8115	c
LGMF585	e	1,165	508	c	664	a	741	b	12,026	d	3,7400	d
LGMF581	e	1,115	505	c	663	a	735	b	12,0855	d	3,7395	d
LGMF615	e	1,145	515	c	658	b	744	b	12,1080	d	4,3650	a
LGMF613	e	1,135	509	c	641	b	736	b	13,1425	b	4,4310	a
LGMF572	e	1,200	479	c	639	b	719	c	12,5890	c	3,8470	c
LGMF614	e	1,120	511	c	639	b	735	b	12,1975	c	4,4485	a
LGMF525	e	1,120	488	c	636	b	712	c	11,5710	e	3,9300	c
LGMF573	e	1,180	488	c	632	b	724	c	13,5905	a	4,0215	b
LGMF515	e	1,125	491	c	631	b	716	c	12,3860	c	4,0905	b
LGMF509	e	1,195	489	c	611	b	728	c	13,4330	a	3,9745	b
LGMF504	e	1,145	487	c	599	b	716	c	12,4005	c	3,9380	c
LGMF522	e	1,170	464	d	594	b	698	c	12,7075	c	4,1515	b
LGMF558	e	1,160	457	d	578	c	689	c	12,5865	c	3,9730	b
LGMF521	e	1,170	452	d	567	c	686	c	12,9905	b	4,0105	b
LGMF552	e	1,175	450	d	567	c	685	c	13,1285	b	3,9075	c
LGMF536	e	1,120	458	d	565	c	682	c	12,0445	d	4,0520	b
LGMF519	e	1,165	448	d	563	c	681	c	11,9265	d	3,9705	b
LGMF531	e	1,140	435	d	557	c	663	d	13,8330	a	3,9790	b
LGMF505	e	1,180	413	e	525	c	649	d	12,4225	c	4,2305	b
LGMF580	e	1,115	375	f	471	d	598	e	12,7810	c	4,3925	a

Nota: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

5.3.1 Reações de PCR espécie-específica

Todos os 120 isolados endofíticos de plantas cítricas e os 43 endófitos da vegetação espontânea presente em pomares cítricos apresentaram uma banda de amplificação com aproximadamente 450 pb com o par de *primers* CgInt/ITS4

(FIGURAS 9 e 10) sendo identificados como pertencentes a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, e não amplificaram com os *primers* Calnt2/ITS4 ou Col1/ITS4, os quais amplificariam bandas com aproximadamente 490 e 520 pb respectivamente.

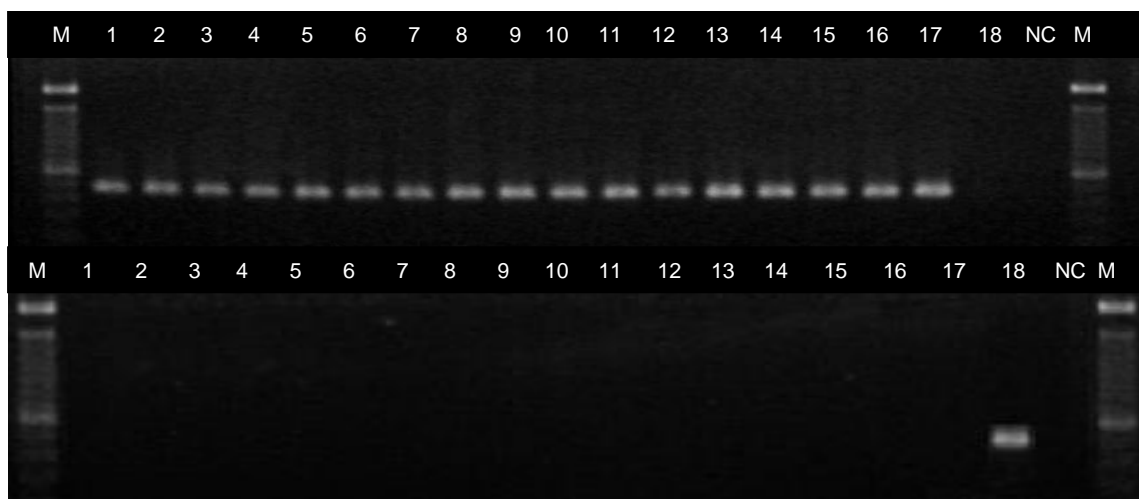


FIGURA 9 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR DE 16 ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS CÍTRICAS UTILIZANDO OS *primers* CgInt/ITS4 (A) ESPECÍFICOS PARA *Colletotrichum gloeosporioides* e Col1/ITS4 (B) ESPECÍFICOS PARA *C. boninense*

Nota: M: marcador de peso molecular ladder 100pb (Invitrogen®); 1 a 16: DNA de isolados endofíticos de folhas cítricas; 17: DNA de isolado referência de *C. gloeosporioides*; 18: DNA de isolado referência de *C. boninense*; NC: controle negativo da reação.

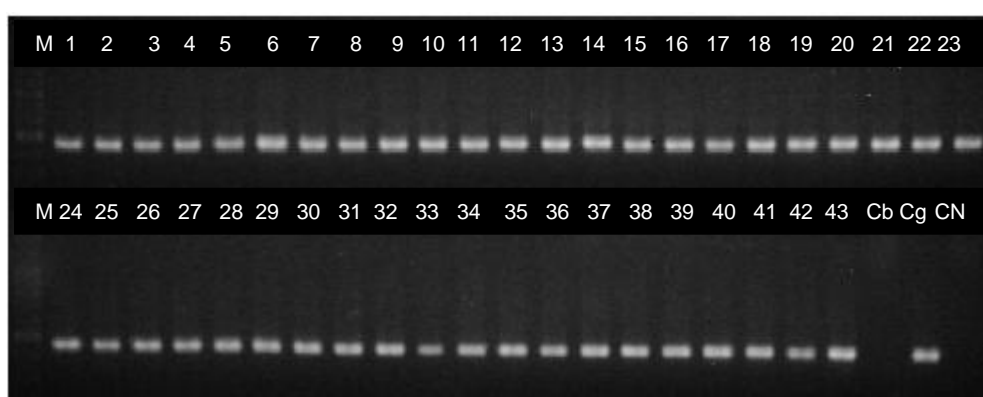


FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR DOS 43 ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA UTILIZANDO O PAR DE *primers* CgInt/ITS4 ESPECÍFICOS PARA *Colletotrichum gloeosporioides*

Nota: M: marcador peso molecular ladder 100pb (invitrogen®) ; DNA dos 43 isolados endofíticos , Cb: DNA de isolado referência de *C. boninense*; Cg: DNA de isolado referência de *C. gloeosporioides*; CN: controle negativo

Do total de isolados obtidos, 70 foram utilizados para o sequenciamento da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA com fragmentos de aproximadamente 600 – 700 pb, e a árvore filogenética gerada (FIGURA 11) confirma a identificação de todos os isolados como pertencentes a espécie *C. gloeosporioides*. Entretanto, revela haver variabilidade entre os isolados obtidos (FIGURA 12). Igualmente é possível observar variabilidade entre estes e a maioria dos isolados referência de *C. gloeosporioides*, o que sugere a possibilidade da existência de mais de uma espécie pertencendo ao complexo *C. gloeosporioides*. Tal separação é mais visível no alinhamento das sequências (FIGURA 11).

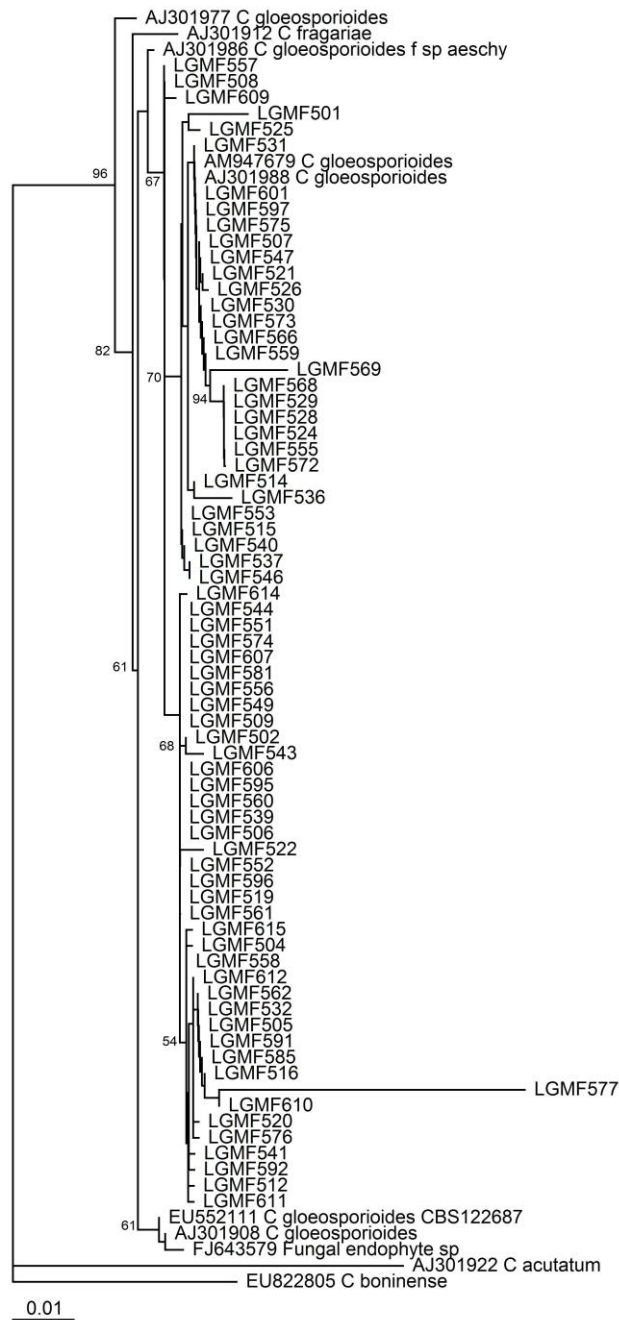


FIGURA 11 – FILOGRAMA BASEADO NA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA DE 70 ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. E 10 ISOLADOS REFERÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES: *C. gloeosporioides* (AM947679, AJ301988, AJ301986, EU552111, AJ301908, AJ301977), *C. fragariae* (AJ301912), *C. acutatum* (AJ301922), E *C. boninense* (EU822805) E FUNGO ENDOFÍTICO (FJ643579). VALORES DE BOOTSTRAP (1.000 REAMOSTRAGENS)

LGMF516	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF532	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF505	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF562	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF576	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF577	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF585	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF591	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF592	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF609	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF610	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF611	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF612	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF614	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF615	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF501	GGACTGATCT AGGGCGGGGT TCATTGCGCG CCTCTGGTCG GAAAGTTATC C
LGMF572	GGACTGATCT <u>AAGGGAGGAG GCAACTCTTC CCCCTGGTCG</u> GAAAGTTATC C
LGMF568	GGACTGATCT <u>AAGGGAGGAG GCAACTCTTC CCCCTGGTCG</u> GAAAGTTATC C
LGMF524	GGACTGATCT <u>AAGGGAGGAG GCAACTCTTC CCCCTGGTCG</u> GAAAGTTATC C
LGMF555	GGACTGATCT <u>AAGGGAGGAG GCAACTCTTC CCCCTGGTCG</u> GAAAGTTATC C
LGMF528	GGACTGATCT <u>AAGGGAGGAG GCAACTCTTC CCCCTGGTCG</u> GAAAGTTATC C
LGMF529	GGACTGATCT <u>AAGGGAGGAG GCAACTCTTC CCCCTGGTCG</u> GAAAGTTATC C

FIGURA 12 - ALINHAMENTO DOS 50 NUCLEOTÍDEOS INICIAIS DA SEQUÊNCIA ITS DO rDNA DE 22 ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* DESTACANDO O POLIMORFISMO OBSERVADO EM 6 ISOLADOS PROVENIENTES DE PLANTAS CÍTRICAS

Observou-se que as sequências de 22 isolados apresentam uma região inicial de aproximadamente 50 nucleotídeos a mais sequenciados do que as demais linhagens utilizadas, inclusive as linhagens referência. Os demais isolados não apresentam tais nucleotídeos iniciais provavelmente pela baixa qualidade apresentada das sequências, e foram portanto removidos; ou pelo *primer* utilizado no sequenciamento (no caso das sequências provenientes do GenBank). Exatamente nesta região, observou-se dois padrões distintos de sequência, separando os isolados em dois grupos (FIGURA 12). Isso sugere a necessidade de resequenciar a região ITS1 destes isolados, inclusive das linhagens referência. Tais resultados são importantes para verificar a existência de mais de uma espécie pertencente ao complexo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tal possibilidade será investigada no futuro também com o sequenciamento de regiões intrônicas de outros genes, como Fator alfa1 de elongação da Tradução (EF), Actina e GPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (MYLLYS; STENROOS; THELL, 2002; GUERBER; LIU; CORRELL, 2003). Independente desta diversidade observada, as figuras 9 e 10 revelam que não foi obtido nenhum isolado de *C. acutatum* ou *C. boninense* nas plantas investigadas. Tais plantas provêm de pomar com incidência da doença Queda Prematura dos Frutos Cítricos causado pelo fungo *C. acutatum*. A metodologia de isolamento empregada é indicada para o isolamento de fungos endofíticos, o que possibilita também o isolamento de fitopatógenos presentes de forma latente nestas plantas. Tal isolamento já foi reportado para *Guignardia citricarpa* em citros por diversos autores (BALDASSARI *et al*, 2008; FABRIS *et al*, em preparação). Os resultados do presente trabalho indicam que o fungo *C. acutatum* não coloniza de forma latente as plantas cítricas e da vegetação espontânea avaliadas no período entre as floradas. A fim de corroborar tais resultados novas coletas em diferentes períodos e outras variedades vegetais devem ser avaliadas. Se tais resultados forem confirmados, indicará um grande avanço no conhecimento da epidemiologia da doença QPFC, direcionando as investigações de formas alternativas de sobrevivência do patógeno em pomares cítricos entre as floradas. Por outro lado, tais resultados sugerem que endofíticos não patogênicos de *C. acutatum* não estariam presentes nestas plantas validando assim os métodos diagnósticos por PCR normalmente empregados.

Para a identificação de *C. gloeosporioides* foi utilizado na reação de PCR o par de oligonucleotídeo CgInt/ITS4 descrito por Mills, Sreenivasprasad e Brown

(1992). No entanto, alguns dos isolados identificados como *C. gloeosporioides* podem pertencer a diferentes espécies. Assim, o par de *primer* CgInt/ITS4 para identificação deste fungo pode ser questionado e mais estudos devem ser realizados a fim de validar tal metodologia de diagnóstico.

6 CONCLUSÃO

O patógeno *Colletotrichum acutatum* não coloniza de forma latente folhas de plantas cítricas bem como da vegetação espontânea avaliadas no Estado de São Paulo, não sendo esta uma estratégia de sobrevivência entre as floradas.

Linhagens não patogênicas do fungo *C. acutatum* não colonizam de forma endofítica as plantas avaliadas o que valida o método diagnóstico do agente causal da QPFC.

Todos os isolados endofíticos analisados foram identificados como pertencentes à espécie *Colletotrichum gloeosporioides*.

O complexo *C. gloeosporioides* provavelmente abriga diferentes espécies não resolvidas utilizando-se sequências ITS. Outros genes devem ser investigados com este propósito.

REFERÊNCIAS

- ABANG, M.M.; WINTER, S.; GREEN, K.R.; HOFFMANN, P.; MIGNOUNA, H.D.; WOLF, G.A. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam antracnose in Nigeria. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n9, p. 63-71, 2002.
- AFANADOR-KAFURI, L., MINZ, D., MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology** 93:579-587. 2003.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of *Colletotrichum gloeosporioides*, the cause of citrus postbloom fruit drop. **Phytopathology** 82: 1084. 1992.
- AGOSTINI, J.P., GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology** 83:485-490. 1993.
- AGRIANUAL 2005. **Anuário da Agricultura Brasileira**. Edição 10ª São Paulo: FNP 521p, 2005.
- ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.U. Caracterização morfocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos de mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25:3389-3402. 1997.
- ARNAUD, L.S.E.P.; SANTOS, C.D.G.; LIMA, J.A.A.; FEITOSA, F.A.A. Predominância de Begamovírus em tomateiros na região produtora de Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. **Fitopatologia Brasileira**, 32 (3): 241-246. 2007.
- ATKINS, S. D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, 45(1): 3-15. 2004.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.;AZEVEDO, J. L. de (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J.L.; JÚNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, vol. 3, nº1, p. 40-65, 2000.
- AZEVEDO, J.L.; SERAFINE, L.A.;BARROS. N.M. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: L.A. SERAFINE; N.M. BARROS e J.L. AZEVEDO. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Indústria**. Editora Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2002. Cap 08, pp.233-265, 2002.

BACON, C.W.;WHITE Jr.;J.F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 487p, 2000.

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. **Oxford: British Society for Plant Pathology**, p.88-120. 1992.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 120, p. 103-110, 2008.

BATISTA, M.F. Planta silvestres hospedeiras de *Colletotrichum guaranicola*. In: Simpósio Brasileiro do Guaraná. **Anais**. Embrapa-UEPAE de Manaus, 409-411. 1984.

BEZUIDENHOUT, C.C.; PRINSLOO, M.; VAN DER WALT, A. M. Multiplex PCR-based detection of potencial fumonisin-producing fusarium in traditional african vegetables. **Environmental Toxicology**, 21(4):360-366. 2006.

BLANCO, C. G. ***Guignardia citricarpa* Kiely**: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Piracicaba, Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 200p. 1999.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology** 86(5):523-527.1996.

BROWN, K.B., HYDE, K.D.; GUEST, D.I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity** 1: 27-51, 1998.

BUSSABAN, B., LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology** 47: 1-6, 2001.

CABRAL, D.; STONE, J.K.; CARROLL, G.C. The internal mycobiota of *Juncus* spp: microscopic and cultural observations of infections patterns. **Mycological Research** 97:367-376, 1993.

CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.

CHAVES, A.L.R.; BRAUN, M.R.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; GALLETI, S. *Erigeron bonariensis*: Hospedeira Alternativa do *Lettuce mosaic virus* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 28: 307-311. 2003.

CHEN, G.; LYN, Y.; WEN, L.; VRIJMOED, L.L.P.; JONES, E.B.G. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea Coast. **Tetrahedron** 59:4907-4909, 2003.

CHEN, H.-Q., DEKKERS, K. L., BURNS, J. K., TIMMER, L. W., AND CHUNG, K.- R.. valuation of growth regulator inhibitors for controlling post-bloom fruit drop (PFD) of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **HortScience** 41:1317-1321. 2006.

CHUNG, K.-R., SHILTS, T., ERTÜRK, Ü., TIMMER, L. W., AND UENG, P. P.. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and post-bloom fruit drop of citrus. **FEMS** 2003.

CHUNG, W.-H., ISHII, H., NISHIMURA, K., FUKAYA, M., YANO, K., AND KAJITANI, Y.. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**. 90:506-512. 2006.

COBUCCI, T.; STEFANO, J.G.di; KLUTHCOUSKI, J. Manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro em plantio direto. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, Circular Técnica 35, 56p. 1999.

Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Site : [http://www.cda.sp.gov.br/www/programas/index.php?action=view&cod=25&ar=2&nm=Sanidade Vegetal](http://www.cda.sp.gov.br/www/programas/index.php?action=view&cod=25&ar=2&nm=Sanidade%20Vegetal), visitado dia 09/08/2009.

DE HOOG, G.S.; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R.B.; KANTARGLIOCU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; HAASE, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. **Journal of Clinical Microbiology** 41:4767–4778, 2003.

DEAN, T. R.; ROOP, B.; BETANCOURT, D.; MENETREZ, M. Y. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. **Journal of microbiological methods**, 61(1):9-16. 2005.

FABRIS, J.; NISHIMURA, R. C.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; FELTRIN, L. SILVANO, C.; GLIENKE, C.; CHRISTO, D. Em preparação. 2009.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annual Applied Biology**, London, v.91, n.1, p.13-20, 1979.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial ground spraying. **Turrialba** 34(2): 179-186. 1984.

FEICHTENBERGER, E. Queda de frutos jovens e citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja** 12(2): 513-521. 1991.

FEICHTENBERGER, E., MÜLLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN, A.F., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.280-284, 1997.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. **Doenças dos citros**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. v.2. Editora Ceres, São Paulo. p. 239-269. 2005

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791, 1985.

FIGUEIREDO J.G., PIMENTEL I.C., VICENTE V.A., PIE M.R., KAVA-CORDEIRO V., GALLI-TERASAWA L.V.; PEREIRA J.O., SOUZA A.Q.L.; GLIENKE, C; High diversity and bioprospecting endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian Journal Microbiology** 53: 1123-1132. 2007.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**.33, 3, 219-226. 2008.

FREEMAN, S., KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease** 82:596-605. 1998.

FREEMAN, S., HOROWITZ, S., SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology** 91 (10): 986-992 OCT 2001.

GEISER D.M., PITT J.I., TAYLOR J.W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:388–393. 1998.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia** 95(5) p. 872-895, 2003.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à queda prematura dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica** 23:5-13. 1997.

GOES, A., CRESTE, J.E. Uso do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) na avaliação de folhas de plantas cítricas com sintomas de queda prematura de frutos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, 26, .2, p.237-240, 2000.

HALL, B. G. Phlogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual for Molecular Biologists. Massachusetts U.S.A.: **Sinauer Associates**, Inc., 2001.

JEFFRIES, P., DODD, J.C., JEGER, M.J. AND PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology** 39: 343-366. 1990.

JELIHOVSCHI, E; FARIA, J.C; OLIVEIRA, S. **The ScottKnott Clustering Algoritm**. UESC, Ilheus, Brasil. 2009.

JOHRI, B.N. Endophytes to the rescue of plants! **Current Science** 90(10): 1315-1316, 2006.

KUBO, Y.; TAKAMP, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, n.12, p.4340-4344, 1996.

KUMAR, D.S.S.; HYDE, K.D. Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity** 17: 69-90, 2004.

KUMAR S, DUDLEY J, NEI M & TAMURA K MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics** 9: 299-306. 2008.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, .N; GOES, A. Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, 2003.

LAHEY K.A, YUAN R, BURNS J.K, UENG P.P, TIMMER LW.; CHUNG KR Induction of phytohormones and differential gene expression in citrus flowers infected by the fungus *Colletotrichum acutatum*. **Mol Plant-Microbe Interact** 17: 1394-1401. 2004.

LENNÉ, J.M. *Colletotrichum* disease in legumes. In: *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). **CAB International**, Wallingford, UK: 237-249, 1992.

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K. R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 128:578-583. 2003.

LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 291-337. 2001.

LORENZI, H. **Plantas daninhas no Brasil**. 3º edição. Nova Odessa, SP. Editora Plantarum. 2000.

LUBBE, C.M., DENMAN, S., CANNON, P.F., GROENEWALD, J.Z., LAMPRECHT, S.C., GROUS, P.W. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of *Proteaceae*. **The Mycological Society of America**, pp. 1268-1279. 2004.

MACLEAN, D.J., BRAITHWAITE, K.S., MANNERS, J.M.; IRWING, J.A.G. How do we identify and classify fungal pathogens in the era of DNA analysis? **Advances in Plant Pathology** 10: 207-244, 1993.

MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M.L.R.; SANTOS, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16(2): 280-283, 2005.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; QUEROL, A.; SUAREZ- FERNANDEZ, M. B.; GARCLA-LOPEZ, M. D.; BARRIO, E. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primer for their identification. **J. Phytopathol.** 151:135-143. 2003.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M.R. dos. **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos**. In: Matioli, S.R. Biologia molecular e evolução. Ed. Holos. 2003.

MENEZES, J. R. Manejo integrado de doenças e plantas daninhas na cultura de feijão. In: COBUCCI, T.; STEFANO, J.G.di; KLUTHCOUSKI, J. Manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro em plantio direto. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, Circular Técnica 35, 56p. 1999.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A ciência do DNA**. 2^o edição. ARTMED, Porto Alegre. 2005.

MILEO, L.J.; BENTES, J.L.S.; SILVA, J.F.; CHRISTOFFOLETI. Plantas de cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola*. **Planta Daninha**, 24(4): 677-683. 2006.

MILEO, L.J.; SILVA, J.F.; BENTES, J.L.S.; CHRISTOFFOLETI. Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no Estado do Amazonas. **Planta Daninha**, 25(4): 771-782. 2007.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* using PCR. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam.v98.1/3p.137-144, 1992.

MORDUE, J.E.M. *Colletotrichum coccoides*. **CMI Description of Pathogenic fungi and Bacteria** 131, 1967.

MORIWAKI, J., SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience** 44: 47- 53, 2003.

MYLLYS, L.; STENROOS, S.; THELL, A. New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-tubulin genes **Lichenologist** 34(4): 237–246, 2002.

MULLIS, K. B., AND F. A. FALOONA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** 155 :335-350. 1987.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 2000.

NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia**, 5, 29, 2002.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 29:32-37, 2002.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; de SOUZA, N. L. Identification of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal Phytopathology**. 150; 128-134. 2002.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema, N.J.; Heuvel, J Van Den (Eds), **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge, U.K: Cambridge University Press.p.175-187. 1986.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, p. 179-197. 1991.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P.; HYDE, K.D. Fungi on *Musa acuminata* in Hong Kong. **Fungal Diversity** 6: 99-106. 2001a.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P.; HYDE, K.D. (Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, in **Thailand**. **Mycological Research** 105: 1508-1513. 2001b.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity** 16: 131-140. 2004.

PILEGGI, S.A.V.; OLIVEIRA, S.F.V.; WACULICZ-ANDRADE, C.E.; VICENTE, V.A.; DALZOTO, P.R.; CRUZ, G.K.; GABARDO, J.; MASSOLA, N.Jr.; TORRES, H.J. Jr.; PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERESAWA, L.V.; PIMENTEL, I.C.; GLIENKE, C. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*, **Canadian Journal of Microbiology**, 55: 1076-1088. 2009.

PROMPUTTHA, I., LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Fungal succession on senescent leaves of *Manglietia garrettii* on Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. **Fungal Diversity** 10: 89-100. 2002.

RODRIGUES, K.F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia** 86: 376-385. 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 3ª edição. CSH Press. 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research** 109(06): 661-686, 2005.

SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P.R., MEEHAN, B. M., BROWN, A. E. Phylogeny and systematic of *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome** 39:499-512. 1996.

SHAW, B. D.; KUO, K.; HOCH, H. C. Germination and apressorium development of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. **Mycologia**, Lawrence, v.90, n.2, p.258-268, 1998.

SILVA, F. A. S. E. AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress On Computers In Griculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: American Society of Agricultural Engineers, p.393-396, 2006.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78. 2002.

SMITH, B.J.; BLACK, L.L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawbwrry. **Plant Disease** 74:69-76, 1990.

SONODA, R.M.; HEBB, J.W. Postbloom fruit drop in the Indian River citrus growing area: history and present status. **Citrus Industry**, 12-81, 1991.

SOUZA, G.F.de; Avaliação de nove espécies de leguminosas como hospedeiros alternativos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Dourados - MS, Tese de doutorado – Universidade Federal da Grande Dourados, 45p. 2007.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany** 66, p.45-54, 1988.

STROBEL, G.A.; Microbial gifts from rain forests. **Canadian Journal of Plant Pathology** 24:14-20, 2002.

STROBEL, G.;DAISY, B.;Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 67, 04: 491-502. 2003.

STROBEL, G.; DAISY,B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytics Microorganisms. **Journal of Natural Products**. 67. 257-268. 2004.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). **CAB International**, 1-26. 1992.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts. 2002.

TAESHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 19: 381-385, 2003.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum acutatum* causin anthracnose of luppins . **Phytopathology** 92: 986-996, 2002.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**.18, 4: 448-459, 2001.

TANG, A.M.C., HYDE, K.D.; CORLETT, R.T. Diversity of fungi on wild fruits in Hong Kong. **Fungal Diversity** 14: 165-185, 2003.

TIMMER, L.W., AGOSTINI, J.P., ZITKO, S.E., ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, a increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**,78, n.4, p.329- 334, 1994.

TOOFANEE, S.B.; DULYMAMODE, R. Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. **Fungal Diversity** 11: 169-175, 2002.

TOZZE JUNIOR, H. J. **Caracterização e identificação de espécies *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. Dissertação de Mestrado . Piracicaba. SP, 2007.

TOZZE JUNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de *Colletotrichum* SP de hortaliças Solanaceas. **Summa Phytopathologica**. Botucatu vol.32 (1) 71-79, 2006.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study of two extreme cases. Uppsala: **Faculty of Science and a Tecnology**, p72, 2004.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. **Sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA na identificação dos isolados de *Colletotrichum* endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.** Monografia de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, 82, p.218-226, 1990.

WILCOX D.; DOVE B.; MCDAVID D.; GREER D.UTHSCSA. Image Tool. University of Texas. Health Science Centre, San Antonio. 2002.